

**POLSKA AKADEMIA NAUK**

**Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego**



**Anna Kosson**

25 305  
H4296

**Aktywność przeciwbólowa  
peptydów opioidowych u myszy  
selekcjonowanych pod kątem  
analgezji postresowej**

**Rozprawa doktorska**

**Pracę wykonano w Zakładzie Neuropeptydów IMDiK  
PAN w Warszawie**

**Promotor: prof. dr hab. n. med. Andrzej W. Lipkowski**

**Warszawa, 2009**

*Serdeczne podziękowania składam promotorowi niniejszej pracy Panu Profesorowi Andrzejowi Lipkowskiemu za wskazanie tematu, opiekę i pomoc w realizacji każdego etapu pracy.*

*Pani Profesor Barbarze Gajkowskiej serdecznie dziękuję za nieocenioną pomoc w badaniach ultrastruktury bariery krew-mózg.*

*Panu Doktorowi Mariuszowi Sacharczukowi dziękuję za udostępnienie materiału badawczego, a także za opiekę naukową i cenne wskazówki.*

*Patrycji Kleczkowskiej dziękuję za pomoc w przeprowadzeniu badań metodą HPLC.*

*Piotrowi Kosson za pomoc w przeprowadzeniu badań in vivo.*

## Wykaz skrótów

- 5-HT – 5- hydroksytryptamina, serotonina
- ACTH – adrenokortykotropina
- Amy – (*amygdalia*) jądro migdałowe
- AVP – (*arginine vasopressin*) wazopresyna argininowa
- BBB – (*blood- brain barrier*) bariera krew- mózg
- Bif – bifalina
- CGRP – (*calcitonin generelated peptide*) peptyd związany z genem kalcytoniny
- CRF – (*corticotrophin- releasing factor*) czynnik uwalniający hormon adrenokortykotropowy
- CRH – (*corticotropin- releasng hormone*) kortykoliberyna
- DA – dopamina
- DRG – (*dorsal root ganglion*) zwój rdzeniowy
- EM-1 – endomorfina- 1
- Form – 5% roztwór aldehydu formaliny
- GABA – kwas gamma- aminomasłowy
- HA – (*high analgesia line*) linia wysokoanalgetyczna
- HPA – (*hypothalamic pituary axis*) oś podwzgórze- przysadka- nadnercza
- HPLC – (*high performance liquid chromatography*) wysokosprawna chromatografia cieczowa
- i.m.* – podanie domięśniowe
- i.v.* – podanie dożylnie
- i.c.v.* – podanie dokomorowe
- i.p.* – podanie dootrzewnowe
- i.t.* – podanie dordzeniowe
- K – nieselekcjonowana linia kontrolna
- LA – (*low analgesia line*) linia niskoanalgetyczna
- LC – (*locus coeruleus*) miejsce sinawe

- MF – morfina
- MPE – (*Maximal possible effect*) maksymalny możliwy efekt
- NA – noradrenalina
- OUN – ośrodkowy układ nerwowy
- p.o. – podanie doustne
- POMC – (*proopiomelanocortin*) proopiomelanokortyna
- s.c. – podanie podskórne
- SP – Substancja P

## Spis treści

Wykaz skrótów .....	3
I. Część teoretyczna .....	7
1. Ból .....	8
1.1. Przewodzenie i moduicja sygnałów bólowych. ....	9
1.1.1. Bramka rdzeniowa. ....	11
1.1.2. Endogenne układy opioidowe. ....	13
1.1.3. Układ noradrenergiczny. ....	16
1.1.4. Układ serotonergiczny. ....	17
1.1.5. Układ GABA- ergiczny. ....	18
1.1.6. Układ cholinergiczny. ....	19
2. Stres. ....	21
2.1. Mechanizm stresu. ....	22
2.2. Anaigezja wywołana stresem. ....	26
3. Bariera krew- mózg. ....	30
3.1. Budowa i funkcje bariery krew- mózg. ....	31
3.2. Zmiany patologiczne w strukturze bariery krew- mózg. ....	35
4. Hipoteza i cel pracy. ....	38
II. Część doświadczalna. ....	41
5. Charakterystyka materiału doświadczalnego. ....	42
5.1. Zwierzęta. ....	42
5.2. Związki opioidowe. ....	43
5.2.1. Morfina .....	44
5.2.2. Bifalina .....	46

5.2.3. AA2016 .....	47
5.2.4. Endomorfina- 1. ....	48
6. Badanie progu bólowego. ....	50
7. Stresowanie zwierząt. ....	54
8. Identyfikacja peptydu opioidowego AA2016 w mózгах selekcjonowanych myszy.....	57
9. Mikroskopia elektronowa.....	58
10. Wyniki- badania <i>in vivo</i> . ....	59
11. Wyniki – badania <i>in vitro</i> . ....	75
12. Badania mikroskopowe bariery krew- mózg. ....	79
13. Dyskusja. ....	90
14. Wnioski. ....	104
15. Streszczenie. ....	106
16. Piśmiennictwo. ....	111

I

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

## 1. BÓL

Ból to nieprzyjemne, czuciowe i emocjonalne doznanie towarzyszące już istniejącemu lub potencjalnie zagrażającemu uszkodzeniu tkanek albo też jedynie odnoszone do takiego uszkodzenia (Wordliczek J. i wsp. 1996). Taką definicję bólu zaproponowało w 1979 roku Międzynarodowe Stowarzyszenie Badania Bólu (*International Association for Study of Pain*). Według tej definicji ból pełni w ustroju zarówno funkcję biologiczną jak i symptomatologiczną. Funkcja biologiczna związana jest z jego ostrzegawczo – ochronnym działaniem, natomiast w przypadku uszkodzeń obejmujących głębokie struktury somatyczne towarzyszący im ból wymusza ograniczenie aktywności, dzięki czemu zmniejsza się potencjalne ryzyko uszkodzenia lub nasilenia zmian patofizjologicznych. Ból jest zawsze zjawiskiem subiektywnym, gdyż odczuwanie bodźców bólowych u każdego człowieka jest uzależnione w dużym stopniu od progu czucia i tolerancji bólu, wcześniejszych doświadczeń bólowych, czy też różnych czynników kulturowo- środowiskowych. Ból który towarzyszy chorobie lub uszkodzeniu tkanek inicjuje rdzeniową i ponadrdzeniową odpowiedź ośrodkowego układu nerwowego, która pomaga ustrojowi w utrzymaniu homeostazy podczas rozwoju procesu patologicznego (Przeklasa- Muszyńska A. i wsp. 2006). Na uwagę zasługuje fakt, że znaczne hamowanie bólu, zwane analgezą, obserwowano zarówno u ludzi jak i u zwierząt pod wpływem takich czynników jak stres, akupunktura, stany emocjonalne takie jak pobudzenie seksualne (Sadowski B. 2006). Zjawisko to nosi nazwę analgezji wywołanej stresem (ang. *Stress Induced Analgesia*) i jest wynikiem działania endogennych układów antynocyceptywnych: opioidowego, noradrenergicznego, cholinergicznego, GABA- ergicznego, do których aktywacji dochodzi w wyniku działania czynników emocjonalnych i stresogennych. Podwyższony poziom endogennych  $\beta$ - endorfin w osoczu krwi obwodowej u kobiet wykonujących ćwiczenia fizyczne (bieganie) po raz pierwszy zaobserwował Carr (Carr D.B. i wsp. 1981). Okazało się, że otarcia



naskórka wywołane intensywnym treningiem nie wywołują u trenujących kobiet bólu, co dało podstawę teorii o udziale endogennych opioidów w hamowaniu bólu w czasie stresu.

Ból receptorowy powstaje w wyniku podrażnienia receptorów bólowych- nocyceptorów. Ze względu na czas trwania impulsacji nocyceptywnej, ból można podzielić na ostry- trwający do trzech miesięcy i przewlekły- trwający powyżej trzech miesięcy lub dłużej pomimo wygojenia się tkanek (Dobrogowski J. i wsp. 2004; Hilgier M. 1999). Proces powstawania bólu nosi nazwę nocycepcji i obejmuje cztery etapy: transdukcję, przewodzenie, modulację, percepcję.

### **1.1 Przewodzenie i modulacja sygnałów bólowych**

Odczuwanie bólu rozpoczyna się i zależy od stymulacji receptorów obwodowych, z których impulsy przekazywane są wzdłuż nerwów czuciowych do rdzenia kręgowego i dalej do wzgórza i kory czuciowej mózgu. Nocyceptory to nagie zakończenia nerwów o wysokim progu pobudzenia w skórze, znalezione prawie we wszystkich tkankach. Ich stymulacja jest pierwszym etapem w generacji odczucia bólu.

W procesie transdukcji energia działającego bodźca uszkodzającego (mechanicznego, termicznego, chemicznego) zostaje zamieniona na impuls elektryczny przewodzony włóknami nerwowymi. Odbywa się to w obwodowych zakończeniach nerwowych neuronu nocyceptorowego tzw. nocyceptorach, zlokalizowanych w obwodowych pierwotnych zakończeniach włókien nerwowych A delta i C, wyspecjalizowanych w przekazywaniu informacji nocyceptywnej (Carr D.B. i wsp. 1999).

Włókna należące do grupy C są zakończeniami bezmielinowymi, bardzo cienkimi i wrażliwym na uszkodzenia. Reagują na bodźce termiczne o temperaturze od 41 do 49°C, przy czym za próg bólu uważa się 44,5°C. Są one również pobudzane przez bodźce mechaniczne ale słabiej niż włókna A

deita. Przewodzenie włóknami typu C odbywa się bardzo powoli- 0,5- 2 m/s. Włókna C są połączone w „siatkę”, dlatego pole obsługiwane przez rozgałęzienia włókien C jest rozległe. Przewodzą one nie tylko bodźce bólowe ale także bodźce świadome- jest to część włókien wrażliwych na histaminę. Na zakończeniach włókien C znajdują się różne receptory a jednymi z ważniejszych są receptory opioidowe (Stein C. 1995).

Zakończenia cienkich włókien mielinowych zaliczanych do grupy A deita szybciej przewodzą impulsy nerwowe, reagują na bodźce mechaniczne, na gorąco lub na oziębienie tkanki (Campbell J.N. i wsp. 1989). Mają one o wiele mniejsze pola receptorowe. Na włóknach tych praktycznie nie ma receptorów opioidowych, natomiast receptory bólowe znajdujące się na tych zakończeniach są zawsze w stanie gotowości (Żylicz Z. i wsp. 2003).

Procesem modyfikującym odczuwanie bólu na poziomie receptorów obwodowych jest sensytyzacja obwodowa. Uraz tkanek zapoczątkowuje powstanie procesu zapalnego. Stymulacja nocyceptywna powoduje wydzielanie substancji P, neurokininy A oraz peptydu CGRP z obwodowych zakończeń włókien aferentnych (Levine J.D. i wsp.1993). Uwolnienie tych peptydów powoduje zmiany pobudliwości czuciowych i sympatycznych zakończeń nerwowych, rozszerzenie naczyń krwionośnych, zwiększenie ich przepuszczalności oraz stymulację komórek zapalnych do wydzielania kolejnych mediatorów stanu zapalnego. Dochodzi do wzrostu poziomu potasu oraz uwolnienia mediatorów prozapalnych w uszkodzonych tkankach t.j. bradykininy, histaminy, prostanoidów, cytokin, substancji P, tlenku azotu oraz produktów przemian kwasu arachidonowego (Dray A. i wsp., 1994). Wszystkie wymienione związki mogą pobudzać nocyceptory o wysokim progu pobudzenia prowadząc do powstania sensytyzacji obwodowej. Po pojawieniu się obwodowej sensytyzacji, nawet stymulacja słabymi bodźcami mechanicznymi, która w normalnych warunkach nie jest odczuwana jako ból, powoduje powstanie bólu. W miejscu uszkodzenia tkanki zwiększa się wrażliwość skóry na bodźce termiczne oraz powiększa się obszar

zwiększonej wrażliwości na bodźce (hiperaigezja) dookoła miejsca uszkodzenia (Maszczyńska l. 1999).

W procesie przewodzenia, informacja nocyceptywna w postaci impulsu elektrycznego dociera do macierzystej komórki nocyceptorowej, która zlokalizowana jest w zwoju korzenia tylnego i powoduje uwalnianie aminokwasów pobudzających: glutaminianów, asparaginianów oraz Substancji P i neurokinin. Te mediatory są transportowane do synaps utworzonych przez ośrodkowe zakończenia pierwotnych włókien aferentnych w rogu tylnym rdzenia kręgowego i pełnią tam rolę neuroprzekaźników albo modulatorów razem z peptydem związanym z genem kalcytoniny, somatostatyną i galianiną .

### **1.1.1. Bramka rdzeniowa**

Informacja nocyceptywna docierająca do wyższych pięter układu nerwowego podlega kontroli układów zstępujących, co pozwala na selekcję i opracowanie impulsacji bólowej. W roku 1911 Head i Holmes postulowali istnienie modulacji wpływającej na odczucie bólu. W roku 1954 Hegbarth i Kerr udowodnił po raz pierwszy, że ponadrdzeniowe ośrodki mózgu mogą kontrolować wstępujące drogi czuciowe. W 1965 roku Melzack i Wall zaproponował istnienie specyficznego układu modulującego przewodzenie informacji bólowej już na poziomie rdzenia kręgowego przedstawiając tzw. „bramkową teorię kontrol bólu”. Teoria ta głosi, że komórki istoty galaretowate są pobudzane przez grube, zmielinizowane włókna nienocyceptywne, a hamowane przez cienkie włókna nocyceptywne. Podrażnienia dotykowe pobudzają włókna grube A $\beta$ . Neurony projekcyjne także ulegają nieznacznemu pobudzeniu iub mogą nie być pobudzane wcale, ponieważ równocześnie aktywowane interneurony wywierają na nie hamujący wpływ. Pobudzenie włókien grubych zamyka bramkę a więc hamuje przewodzenie bodźców nocyceptywnych. W momencie gdy podrażnienie przekracza próg pobudliwości bólowej nocyceptorów, zostaje

nasilone pobudzenie cienkich włókien C. Wskutek adaptacji maleje częstość impulsów we włóknach grubych, czego wynikiem jest spadek presynaptycznego oddziaływania neuronów wstawkowych istoty galaretowatej. Bramka rdzeniowa otwiera się i neurony projekcyjne przesyłają impulsy nocycceptywne do wyższych pięter układu nerwowego. Zgodnie z teorią Melzacka i Walla pobudzenie grubych włókien A $\beta$  związanych z czuciem dotyku i ucisku może hamować czynność neuronów nocycceptywnych (Melzack R. i wsp. 1965; Werka T. i wsp. 2000). Hipoteza udziału zstępujących układów w moduliacji bólu została potwierdzona wraz z odkryciem zjawiska analgezji wywołanej drażnieniem elektrycznym (ang. *Stimulation Produced Analgesia- SPA*). Wykazano, że drażnienie różnych ośrodków mózgu, a szczególnie istoty szarej okołowodociągowej (PAG) u zwierząt prowadzi do analgezji, podobnej do efektu działania wysokich dawek morfiny (Antkowiak B. i wsp. 1998).

\*

W komórkach rogów tylnych rdzenia kręgowego i układzie rdzeniowo-wzgórzowym dochodzi do modulowania przewodzonych impulsów, którego rezultatem jest zahamowanie uwainiania neuroprzekaźników z ośrodkowych zakończeń pierwotnych włókien aferentnych.

Róg tylny rdzenia kręgowego zbudowany jest z 5 warstw komórek nerwowych, które różnią się od siebie morfologicznie. Większość komórek warstwy I i II związane są z nocyccepcją. Warstwy komórek III i IV też są związane z procesem nocyccepcji ale większość to interneurony tworzące połączenia z interneuronami warstwy III i IV sąsiednich fragmentów rdzenia oraz interneurony GABA-ergiczne i enkefalinergiczne biorące udział w procesie modulacji. Ośrodkowe zakończenia włókien A deita i C dochodzą przede wszystkim do warstwy I, II i V. Ośrodkowe zakończenia włókien A delta tworzą synapsy z neuronami w warstwie I i V, natomiast peptydoergiczne włókna C dochodzą do warstwy I i V, a niepeptydoergiczne do warstwy II. Komórki warstwy V mają duże pola receptorowe i mogą być pobudzane przez stymulację o bardzo szerokim zakresie natężenia. W

komórkach rogów tylnych i całym układzie rdzeniowo- wzgórzowym dochodzi do modulowania przewodzonych impulsów. Efektem tego jest zahamowanie uwalniania neuroprzekaźników z ośrodkowych zakończeń pierwotnych włókien aferentnych lub modulowanie aktywności neuronów rogu tylnego.

Dopływ informacji bólowych z pierwotnych włókien aferentnych do wyższych pięter układu nerwowego znajduje się pod kontrolą układów zstępujących, co pozwala na selekcję informacji bólowej. W procesie modulacji biorą udział zarówno „mechanizmy wewnętrzne” na poziomie rogu tylnego jak i zstępujący układ antynocyceptywny w skład którego wchodzi:

- kora zakrętu obręczy;
- substancja szara okołowodociągowa w śródmózgowiu (*PAG*);
- substancja szara okołokomorowa w podwzgórzu;
- boczne i grzbietowo- boczne części mostu, zawierające neurony noradrenergiczne;
- brzuszno- dogłowa część rdzenia przedłużonego zawierająca neurony serotoninerdyczne, zlokalizowane zwłaszcza w jądrze wielkim szwu.

Hamowanie zstępujące powstaje poprzez działanie endogennych układów opioidowych oraz innych neurotransmiterów, takich jak noradrenalina, serotonina, GABA, acetylocholina.

### 1.1.2 Endogenne układy opioidowe

Spośród czynników odpowiedzialnych za modulowanie przewodzenia bodźców bólowych wyodrębnia się grupę receptorów i ich endogennych ligandów tworzących system opioidowy.

Receptory opioidowe należą do grupy siedmiodomenowych trans membranowych receptorów metabotropowych *mu*, *delta*, *kappa*, kodowanych przez niezależne geny (Załucki G. 1995). Ich struktura składa się z siedmiu

transbłonowych, hydrofobowych domen oraz trzech pętli i C- końcowego fragmentu skierowanych do wnętrza komórki (Ryc. 1). Pozostałe trzy pętle oraz N- końcowy fragment znajdują się na zewnątrz komórki. Ligandy receptorów wiążą się z ich zewnątrzkomórkową częścią. Prowadzi to do zmian konformacyjnych białka receptorowego, w wyniku czego do wewnątrzkomórkowej części receptora przyłącza się białko G. Pobudzenie tych receptorów powoduje zahamowanie aktywności cykazy adenylowej i zwiększenie przepuszczalności kanałów potasowych oraz zmniejszenie przepuszczalności kanałów wapniowych (Przewłocki R. i wsp. 2001).

W układzie nerwowym wyróżnia się trzy odrębne rodziny endogennych peptydów opioidowych, których prekursorami są:

- proopiomelanokortyna (*POMC*);
- proenkefalina;
- prodynorfina.

Peptydy opioidowe powstają ze swoich prekursorów drogą cięcia enzymatycznego, w którym uczestniczą enzymy: enkefalinaza i aminopeptydaza N. Cechą charakterystyczną wszystkich peptydów opioidowych jest identyczna sekwencja aminokwasów na końcu N łańcucha polipeptydowego: H-Tyr-Gly-Gly-Phe (Carr D.B. i wsp. 1984).

Wśród peptydów powstających z proopiomelanokortyny wymienia się  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ - endorfinę. Syntetyzowane są one w komórkach zlokalizowanych w jądrze łukowatym podwzgórza, jądrze pasma samotnego oraz w przysadce, która jest głównym miejscem syntezy.  $\beta$ - endorfina jest najlepiej poznanym przedstawicielem tej rodziny; przypisuje jej się istotną rolę w reakcji na stres, w przewodzeniu bodźców bólowych, w regulacji hormonalnej i w regulacji układu immunologicznego. Jest ligandem receptorów opioidowych *mu* i *delta* (Smith M. E. 2006; Carr D. B. i wsp. 1981).

Proenkefalina jest źródłem enkefalin i kilku dłuższych peptydów. Występują one w prążkowiu, podwzgórzu i śródmózgowiu, w mniejszym zaś stężeniu w układzie limbicznym, w korze mózgowej, przysadce i rdzeniu

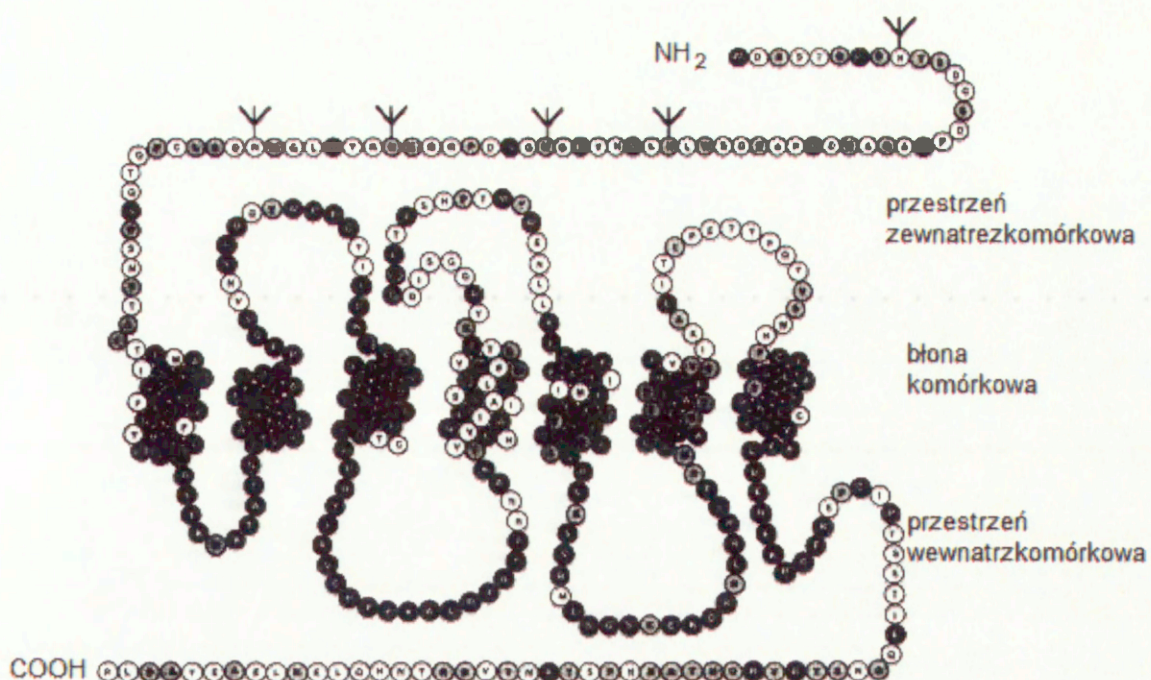
kręgowym. Biorą udział w procesie nocycepcji, w procesach motywacyjnych czy w procesach drgawkowych (McLaughlin P. J. 2006; Kew D. i wsp. 1990).

Prodynorfina jest substratem dla dynorfiny A i B a- i b-neoendorfin oraz kilku większych białek (Misicka A. i wsp. 1998). Występują zwłaszcza w podwzgórzu, prążkowi, substancji czarnej, substancji szarej okołowodociągowej, układzie limbicznym, przysadce i rdzeniu kręgowym. Znany jest ich wpływ na procesy motywacyjne, na pobieranie wody i pokarmu oraz na zjawisko bólu (Przewłocki R. i wsp. 2001; Spampinato S. 2006; Smith A. P. i wsp. 1988).

Te opioidowe peptydy są naturalnymi ligandami dla receptorów opioidowych: *mu*, *delta* i *kappa*. Receptory opioidowe powstają w komórkach lub neuronach zwoju rdzeniowego, skąd są śródaksonalnie transportowane do rogów tylnych, a w przypadku rozwoju stanu zapalnego także do obwodowych zakończeń pierwotnych aferentnych. Stan zapalny indukuje w zwoju rdzeniowym (*DRG*) syntezę, a następnie śródaksonalny transport receptorów opioidowych. W komórkach immunokompetentnych (makrofagi, limfocyty, mastocyty), znajdujących się w obrębie zmienionych zapalnie tkanek, stwierdzono obecność endogennych peptydów opioidowych oraz mRNA dla proopiomelanokortyny i proenkefaliny.

Receptory opioidowe zlokalizowane są w rogach tylnych zarówno pre- jak i postsynaptycznie, a mechanizm działania agonistów receptorów opioidowych może mieć charakter:

- hamowania presynaptycznego i wynika z otwarcia kanału potasowego i zamknięcia kanału wapniowego. Następstwem tego jest zahamowanie uwalniania neuroprzekazników (SP, aminokwasy pobudzające) z ośrodkowych zakończeń pierwszego neuronu „drogi bólowej”;
- hamowania postsynaptycznego- spowodowanego hyperpolaryzacją neuronów rogów tylnych;
- zniesienia hamowania kompleksu neuronu GABA-ergicznego i enkefalinergicznego (Wordliczek J. i wsp. 2004).



Ryc.1. Mode receptora opioidowego *mu* (wg. Minami M. i wsp. 1995)

Ostatnio wykazano w mózgu obecność nowej grupy ligandów dla receptorów opioidowych. Należy do niej endomorfina-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>) i endomorfina-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>). Obie endomorfiny mają charakterystyczną atypową budowę i wydają się być selektywnymi, endogennymi ligandami receptora *mu*. Endomorfina-1 znajduje się głównie w mózgu, a endomorfina-2 przede wszystkim w rdzeniu kręgowym (Janson W. i wsp. 2004; Bujdoso E. i wsp. 2001; Csullog E. i wsp. 2001).

Blokerem receptorów opioidowych jest nalokson (Janson W. i wsp. 2004).

### 1.1.3 Układ noradrenergiczny

Ośrodkowy układ noradrenergiczny składa się z trzech szlaków: grzbietowego, brzuszego i pęczka okołokomorowego. Szlak grzbietowy tworzą aksony komórek znajdujących się w miejscu sinawym (*locus coeruleus*- LC) dochodzące do kory mózgu i struktur limbicznych. Szlak brzuszny rozpoczyna się w nakrywce mostu i rdzeniu przedłużonym i dochodzi do struktur podkorowych, jądra migdałowatego, kory gruszkowej,



przegrody i wzgórze. Trzeci szlak składa się z komórek znajdujących się w obrębie istoty szarej okołokomorowej (Przewłocki R. i wsp. 2001).

Połowa noradrenergicznych neuronów mózgu znajduje się w miejscu sinawym. Zakończenia nerwowe tych neuronów tworzą wiele synaps, dlatego też do uwolnienia noradrenaliny dochodzi na obszarze znacznie większym niż ma to miejsce w przypadku neuronów somatycznych. LC jest strukturą zaangażowaną w regulację układu uwagi oraz aktywność autonomicznego układu nerwowego.

Noradrenalina jest przekąźnikiem z grupy amin katecholowych, do których należy jeszcze adrenalina i dopamina (Antkowiak B. i wsp.1998). Prekursorem wszystkich katecholamin jest aminokwas L- tyrozyna. Noradrenalina jest przekąźnikiem w ośrodkach modulujących transmisję informacji bólowej. Podobnie jak serotonina, noradrenalina jest zwrotnie wychwytywana przez zakończenia synaptyczne a część uwolnionej noradrenaliny jest rozkładana przez enzymy monoaminooksydazę i katechol-O- metylotransferazę (Antkowiak B. i wsp.1998; Carruba M. O. i wsp. 1992; Thierry A. M. i wsp.1968; Świderski T. 1998). Wyróżnia się dwie główne klasy receptorów adrenergicznych- *alfa* i *beta* a w ich obrębie subpopulacje- *alfa1* i *alfa 2* oraz *beta1*, *beta2* i *beta 3*. Większość noradrenergicznych neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym wykazuje działanie hamujące, co w praktyce klinicznej wykorzystuje się w celu wywołania lub nasilania analgezji poprzez zastosowanie agonistów adrenergicznych receptorów *alfa 2*. Zstępujący szlak noradrenergiczny pobudzany jest zarówno przez ostre bodźce nocycytywne, jak i w warunkach długotrwałego zapalenia (Antkowiak B. i wsp.1998).

#### **1.1.4 Układ serotonergiczny**

5-Hydroksytryptamina powstaje z aminokwasu L-tryptofanu w neuronach serotonergicznym (Wang Q. P. i wsp. 1994). Po uwolnieniu w synapsie jest ponownie wychwytywana zwrotnie przez zakończenia synaptyczne i magazynowana w pęcherzykach synaptycznych.

Niewykorzystana serotonina jest unieczynniona przez enzymy: monoaminooksydazę i katechol-O-metylotransferazę (Załucki G. 1995).

Wyróżnia się siedem głównych klas receptorów serotonergicznymi:  $5-HT_1$  do  $5-HT_7$  a wśród nich podklasy. Receptor  $5-HT_3$  jest receptorem jonotropowym i jego pobudzenie powoduje otwarcie kanałów sodowych i wapniowych a w konsekwencji depoiaryzację błony komórkowej i pobudzenie neuronu (Marchut M. 1989). Pozostałe receptory są receptorami metabotropowymi i ich aktywacja pobudza lub hamuje syntezę cyklicznego AMP (Sadowski B. 2006).

Neurony serotonergiczne ( $5-HT$ ) znajdują się głównie w jądrach szwu i mają swoją projekcję zarówno do istoty szarej okołowodociągowej (*PAG*), podwzgórza oraz kory mózgowej, jak i do I, II i V warstwy rogów tylnych. Neurony  $5-HT$ , które rzutują do rogów tylnych, hamują postsynaptycznie neurony dróg rdzeniowo- wzgórzowych, prawdopodobnie hamują presynaptycznie uwalnianie m.in. SP z ośrodkowych zakończeń pierwotnych aferentnych oraz aktywują GABA-interneurony w rogach tylnych rdzenia kręgowego. Serotonina uczestniczy w regulacji takich funkcji fizjologicznych jak pobieranie pokarmu, sen, zachowania seksualne, czynność gruczołów wydzielania wewnętrznego. Serotonina wpływa też na czynności psychiczne i upośledzenie jej wydzielania jest przyczyną stanów depresyjnych (Hammond D.L. i wsp 1984). Serotonina jest jednym z przekaźników w układzie hamującym czucie bólu. W zależności od klasy pobudzanych receptorów 5- hydroktryptamina może ułatwiać przepływ impulsów bólowych w rogach grzbietowych rdzenia, a więc działać pronocyceptywnie, albo może działać antynocyceptywnie hamując transmisję bólu (Wang Q. P. i wsp. 1994).

#### **1.1.5. Układ GABA-ergiczny**

Kwas gamma-aminomasłowy (GABA) oraz glicyna należą do aminokwasów hamujących. Kwas gamma- aminomasłowy tworzy się z kwasu glutaminowego pod wpływem dekarboksylazy, jak również jest

wychwytywany z płynu zewnątrzkomórkowego, przez komórki nerwowe. Znaczną większość neuronów GABA-ergicznych stanowią neurony pośredniczące o krótkich aksonach (Traczyk Z. i wsp. 1989). GABA działa poprzez dwa rodzaje receptorów:  $GABA_A$  i  $GABA_B$  hamując uwalnianie pronocyceptywnych neuroprzekaźników (Miiian M.J. 2001; Stamford J.A. 1995). Receptory  $GABA_A$  są receptorami sprzężonymi z kanałami dla jonów chlorkowych natomiast receptory  $GABA_B$  są receptorami metabotropowymi sprzężonymi poprzez białko G z kanałami dla jonów wapnia i potasu. Układ GABA-ergiczny w rdzeniu kręgowym jest odpowiedzialny za stałe hamujące oddziaływanie na aferentny przepływ informacji czuciowej. Odczyn zapalny indukuje gwałtowny wzrost aktywności układu GABA-ergicznego w ośrodkowym układzie nerwowym (Wordliczek J. i wsp.1996; Sadowski B. 2006; Świdorski T. 1998).

#### 1.1.6. Układ cholinergiczny

Układ przywspółczuiny reprezentują dwa kompleksy neuronów cholinergicznych, które projektują do kory mózgowej, jądra grzbietowego szwu, miejsca sinawego, mostu, układu siatkowatego i rdzenia kręgowego. Układ ten działa poprzez receptory muskarynowe i nikotynowe. Ich pobudzenie zwiększa poziom wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia, czego następstwem jest uwolnienie neuroprzekaźników antynocyceptywnych w układzie noradrenergicznym i/lub serotoninergetycznym. Ponadto pobudzenie receptorów muskarynowych prowadzi do otwarcia kanałów dla jonów potasu, hiperpolaryzacji oraz zahamowania uwalniania pronocyceptywnych neuroprzekaźników (Przekiasa- Muszyńska A. i wsp. 2006).

Acetylocholina jest syntetyzowana w neuronach z cholicy i kwasu octowego przy udziale enzymu acetylotransferazy cholinowej. Po uwolnieniu do szczeliny synaptycznej i zadziałaniu na receptory w błonie postsynaptycznej acetylocholina ulega rozkładowi przy udziale enzymu esterazy cholinowej, na nieczynne składniki – kwas octowy i cholinę. Cholina

jest zwrotnie wychwytywana przez zakończenia synaptyczne i wykorzystywana do syntezy nowej porcji przekaźnika. Receptory acetylocholiny są receptorami jonotropowymi i ich aktywacja powoduje otwarcie kanałów sodowych, wejście jonów sodu do komórki i depolaryzację błony komórkowej (Sadowski B. 2006). Antagoniści receptorów muskarynowych odwracają anażę wywołaną przez stres (Traczyk Z. i wsp. 1989).

\*

Z rogów tylnych rdzenia kręgowego informacja nocycyptywna przekazywana jest do wyższych pięter ośrodkowego układu nerwowego trzema drogami zlokalizowanymi w przednio- boczny kwadrancie istoty białej rdzenia kręgowego i w sznurach tylnych. Są to:

- drogi rdzeniowo- wzgórzowe:

\*boczna droga rdzeniowo- wzgórzowa (*tractus spinothalamicus lateralis*) - aksony pochodzące z neuronów warstwy I i V szybko przekazują informację do wzgórza o dokładnej lokalizacji i charakterze bodźca a informacja ta jest projektowana ze wzgórza do somatosensorycznej kory mózgowej;

\*przyśrodkowa droga rdzeniowo- wzgórzowa (*tractus spinothalamicus medialis*) – znacznie wolniej przekazuje informację nocycyptywną do środkowej części wzgórza, mostu, substancji szarej okołowodociągowej i podwzgórza. Informacja ta jest projektowana do kory mózgowej i układu limbicznego.

- droga rdzeniowo- śródmózgowa i rdzeniowo- siatkowata- przewodzą impulsy do tworów siatkowatego mostu, wzgórza i podwzgórza, a informacje przesyłane tymi drogami są odpowiedzialne za motywacyjno- afektywny wymiar bólu jak i za inicjowanie neuroendokrynnej odpowiedzi na uraz, której

celem jest utrzymanie homeostazy. (Brookoff D. 2001; Dickenson A.H. 1995; Woźniak W. 1998).

Percepcja jest końcowym etapem w procesie nocycypcji i ma miejsce w mózgowiu, a głównie w korze mózgowej i układzie limbicznym, które są odpowiedzialne za uświadomienie działania stymulacji bólowej, jej ocenę oraz reakcje emocjonalne. Tutaj powstaje lęk, agresja oraz kształtują się modele zachowań związanych z zapamiętaniem bólem (Przeklasa-Muszyńska A. i wsp. 2006; Wordliczek J. i wsp. 2004).

## 2. Stres

Uszkodzenie tkanek powoduje nie tylko wystąpienie bólu ale także zaburza mózgowy układ utrzymujący homeostazę. Przez to powoduje stres i zapoczątkowuje złożone procesy mające na celu przywrócenie homeostazy. Hans Selye, który zapoczątkował badania nad stresem, traktuje go jako uszkodzenie fizyczne, infekcję lub patologię, ale także podkreśla wagę stresu psychicznego (Melzac R. 1999).

Stres rozumiany jako konieczność zmierzenia się z wymaganiami stawianymi przez warunki środowiskowe, w którym znajduje się dany organizm, pociąga za sobą aktywację układów neuronalnych i neurohormonalnych. Adaptacja do stresu jest procesem dynamicznym, koordynowanym przez struktury ośrodkowego układu nerwowego. W proces ten włączone jest postrzeganie informacji dopływających z receptorów, integrowanie ich z wcześniejszymi doświadczeniami, neuronalne i neurohormonalne dostosowywanie się do aktualnych wymagań, inicjowanie reakcji behawioralnej, uruchomienie dróg neuronalnych odpowiadających za wzrost pobudzenia emocjonalnego, natężenie uwagi i właściwą reaktywność, a także wygaszenie zachowań, które w obliczu stresu nie mają znaczenia adaptacyjnego (Tatet G.E. i wsp. 2003; Baszczyńska B. 2007). Duże znaczenie w mechanizmie stresu ma zaburzenie czynności osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (*HPA, hypothalamic pituitary adrenal axis*), związane z nasileniem uwalniania kortykoliberyny (*CRH, corticotropin-releasing*



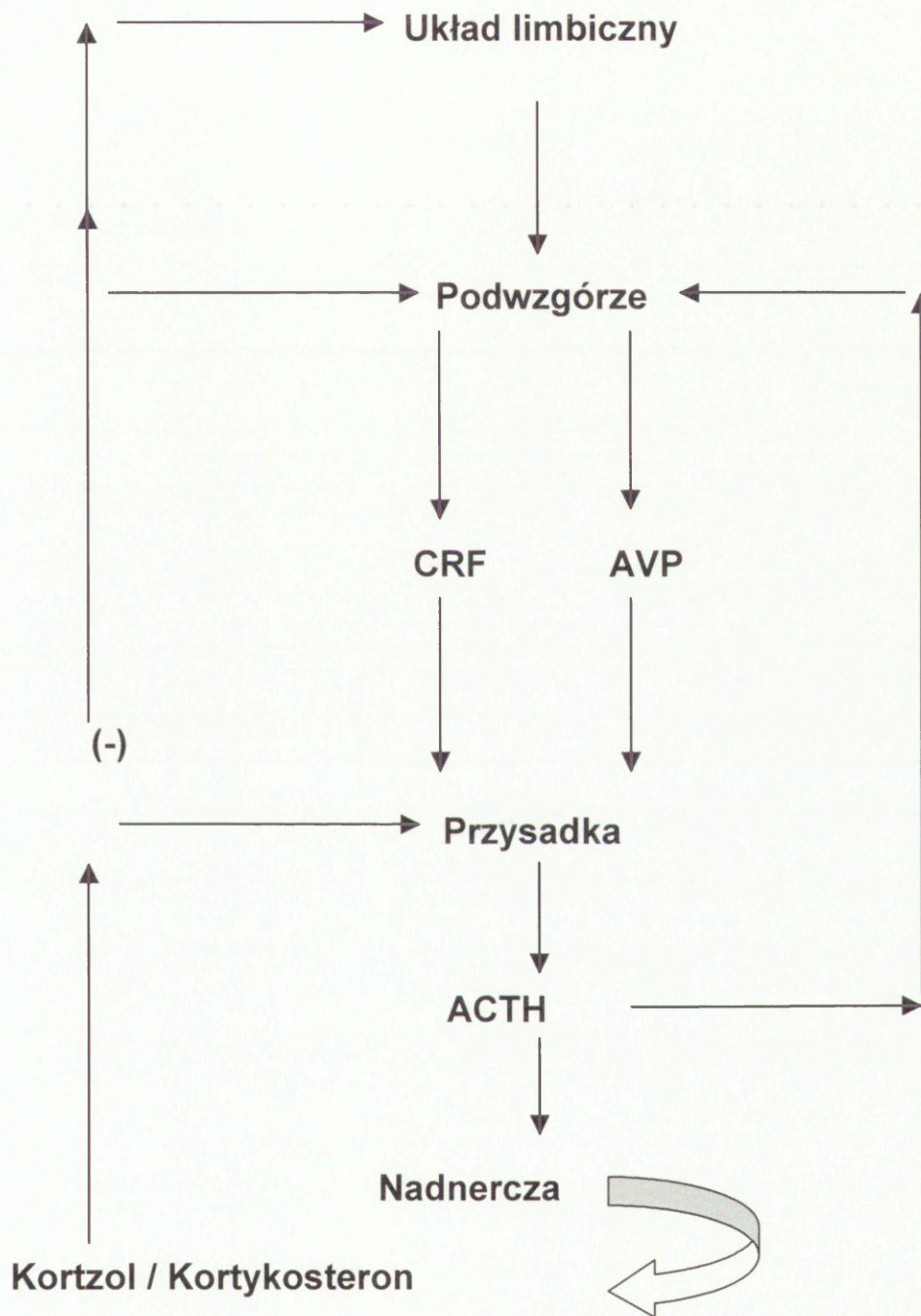
*hormone*), określanej też jako czynnik uwalniający hormon adrenokortykotropowy (*CRF, corticotropin-releasing factor*). Wazopresyna argininowa (*AVP, arginine vasopresin*), która jest wydzielana wspólnie z tym hormonem w stresie, działa z nim synergistycznie (Carrasco G.A. i wsp. 2003; Maunder R. 2000; Wideman C.H. i wsp. 1996).

## 2.1 Mechanizm stresu

Po wystąpieniu uszkodzenia, informacja czuciowa szybko alarmuje mózg i zapoczątkowuje złożoną sekwencję zdarzeń, mających na celu przywrócenie homeostazy. W kilka sekund po uszkodzeniu uwalniane są cytokiny. Związki, takie jak:  $\gamma$ -interferon, interleukiny 1 i 6, TNF dostają się do krwioobiegu w ciągu 1-4 min. a następnie są przenoszone do mózgu. Dzięki temu cytokiny są w stanie aktywować włókna, które wysyłają informację do mózgu oraz przenikać jednocześnie barierę krew- mózg w specyficznych miejscach, mając przez to natychmiastowy wpływ na komórki podwzgórza. Sekwencją działań cytokin jest uwoinienie glukozy i wykorzystywanie jej w niezbędnych procesach t.j. usuwanie martwych tkanek, naprawa uszkodzeń oraz czasami usuwanie gorączki, zwaiczanie bakterii i innych obcych substancji. Przy wystarczająco poważnym uszkodzeniu zostaje zaktywowany układ noradrenergiczny. Do krwioobiegu uwainiana jest adrenaiina, a układ miejsce sinawe/noradrenalina (LC/NA), znajdujący się w pniu mózgu, wysyła informację na wyższe pietra do mózgowia, oraz na niższe przez zstępujący współczuiny układ nerwowy. Zostaje aktywowany cały układ współczulny, aby zapewnić gotowość serca, naczyń krwionośnych i innych narządów do wszczęcia złożonych programów przywracających homeostazę (Chrousus G.P. i wsp. 1992; Yamada K. i wsp. 1995).

Działanie czynnika stresowego na organizm wzbudza impulsację aferentną, która dociera do struktur kręgu limbiczno- śródmózgowiowego, w tym i do podwzgórza oraz do układu siatkowatego pnia mózgu (Ryc.2). Struktury te integrują odpowiedź ustroju na czynniki patogenne. Impuisacja z

Struktury te integrują odpowiedź ustroju na czynniki patogenne. Impulsacja z układu limbicznego a także impulsacja przewodzona przez włókna związane z drogami aferentnymi typowymi dla poszczególnych rodzajów stresorów zbiegają się na neuronach drobnokomórkowej części przyśrodkowej jąder przykomorowych podwzgórza (*nuclei paraventriculares, NPV*). Neurony te syntetyzują kortykoliberynę (*CRH*), a niektóre z nich ponadto syntetyzują wazopresynę (Charmandari E. i wsp. 2005). Aksony neuronów części drobnokomórkowej jąder przykomorowych biegną ku zewnętrznej wyniosłości środkowej (*eminentia mediana*), gdzie kończą się na naczyniach krążenia wrotnego przysadki. Zadziałanie czynnika stresowego przyczynia się więc do zwiększonego wydzielania do krwi naczyń wrotnych przysadki kortykoliberyny jak i wazopresyny. Na komórkach kortykotrofowych części gruczołowej przysadki znajdują się receptory zarówno dla kortykoliberyny jak i wazopresyny; uwalniają one do krążenia ogólnego pochodne proopiomelanokortyny: adrenokortykotropinę peptydy opioidowe. Adrenokortykotropina nasila wydzielania glikokortykosteroidów (u gryzoni- kortykosteron, u naczelnych- kortyzol) (Guzek J.1998).

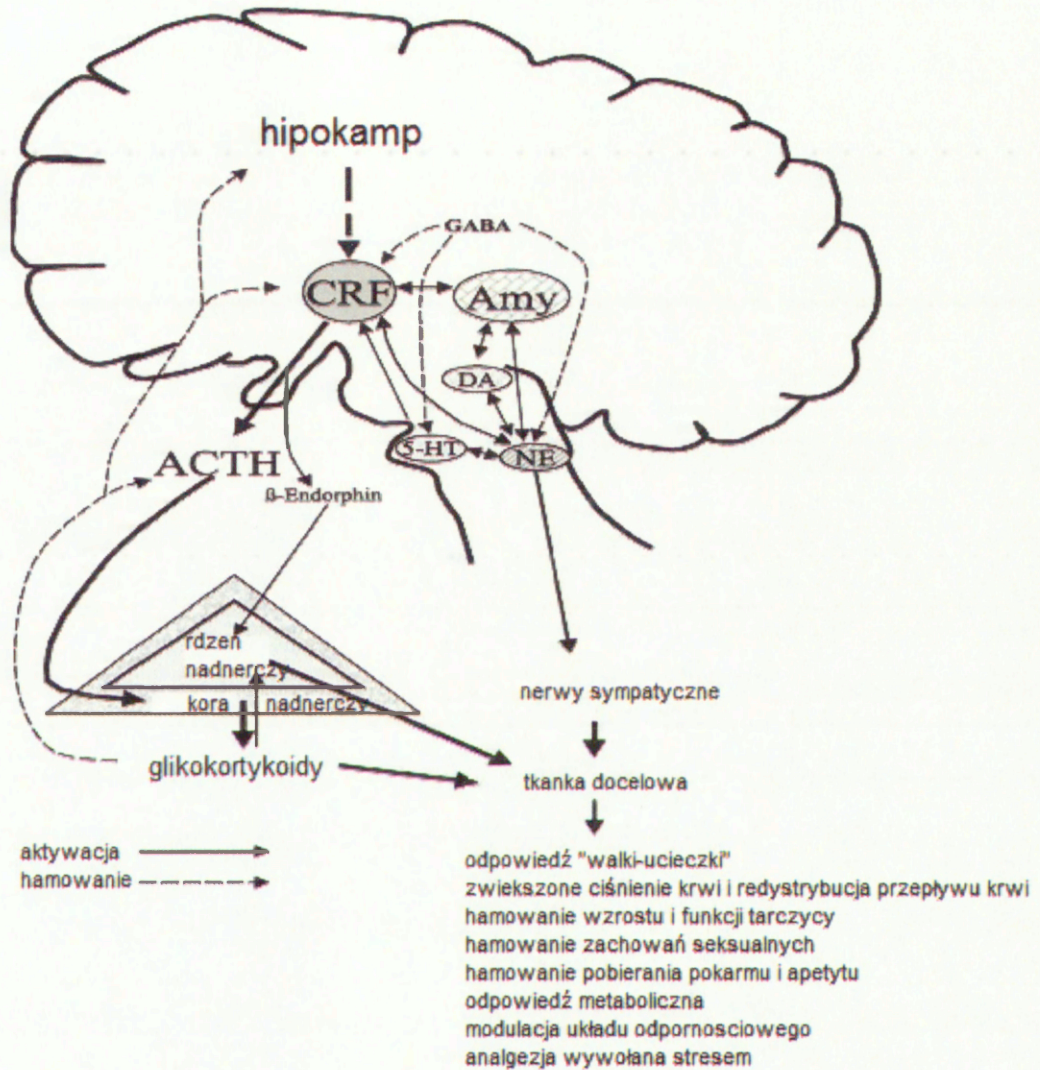


Ryc. 2. Stres. Oś limbiczno- podwzgórzowo- przysadkowo- nadnerczowa: hamowanie zwrotne .(wg J. Landowski, 2002)

W roku 1966 Mangili i wsp. stwierdzili, że podwzgórze, jądro przegrody oraz jądro migdałowe regulują wydzielanie adrenokortykotropiny. Wykazano że, elektryczna stymulacja tych miejsc zmniejsza wydzielanie



adrenokortykotropiny spowodowane stresem, natomiast zniszczenie tych ośrodków zwiększa jej sekrecję (Funahashi A. 1984).



Ryc.3. Układy mózgowie zaangażowane w regulację neuroendokrynej odpowiedzi na stres.

CRF- czynnik uwalniający kortykotropinę w podwzgórzu; 5- HT- serotonina w jądrze grzbietowym szwu; NE- nor epinefryna w miejscu sinawym; DA- dopamina; Amy- jądro migdałowe; GABA- kwas gamma- aminomasłowy (Carrasco G.A, Van de Kar L.D., 2003)

Jak wspomniano wcześniej, reakcja organizmu na stres wiąże się z osią HPA i jest uruchamiana poprzez zwiększenie wydzielania CRH w jądrze

przykomorowym podwzgórza (Lariviere W.R. i wsp. 2000) (Ryc.3). Peptyd ten pełni ważną funkcję w reakcji organizmu na bodźce stresowe, nasilając wydzielanie ACTH i glikokortykosteroidów. Wywiera ponadto siłne własne działanie psychotropowe, wśród których dominują reakcje lękowe i depresyjne oraz zaburzenia regulacji snu i odżywiania (Dunn A. i wsp.1990; Wolkovitz O.M. i wsp.1999; Wolkovitz O.M. i wsp. 2001; Wolkovitz O.M. i wsp. 2002). Kortykoliberyna, niezależnie od klasycznych działań hormonalnych polegających na pobudzeniu kolejnego, niższego piętra osi HPA, wywiera wiele działań psychotropowych przypominających zaburzenia obserwowane podczas stresu, depresji i wielu zespołów lękowych. Podanie CRH zwierzętom laboratoryjnym wywołuje objawy lęku i reakcje depresyjne. Obserwuje się również upośledzenie łaknienia oraz zaburzenia snu, a także wiele zaburzeń somatycznych, takich jak podwyższenie ciśnienia tętniczego krwi i przyspieszenie czynności serca (Owens M.J. i wsp. 1991). Linie szczurów selekcyjowane w kierunku fenotypu charakteryzującego się zwiększonym lękiem, mają podwyższone stężenie CRH w mózgu (Holsboer F. 1999). Wprowadzenie do genomu myszy dodatkowego genu syntetyzującego CRH zwiększa zachowania lękowe i nasila reakcje zwierząt na stres. Z kolei myszy pozbawione wskutek manipulacji genetycznych genu syntetyzującego CRH lub genu syntetyzującego receptory dla tego hormonu są mniej lękliwe i słabiej reagują na bodźce stresowe (Holsboer F. 2000; Holsboer F. 2001). CRH działa przeciwbólowo zarówno u ludzi jak i u zwierząt doświadczalnych. Prawdopodobnie efekt ten jest w dużej mierze wywoływany poprzez stymulację wydzielania  $\beta$ -endorfiny. (Lipkowski A.W. i wsp.1993; Cepeda M.S. i wsp. 2004; Lariviere W.R. i wsp.2000). U szczurów nie syntetyzujących wazopresyny (szczep Brattleboro) wydzielanie adrenokortykotropiny jak i endorfin w warunkach stresu obniża się.

## **2.2 Analgezia wywołana stresem**

Wrażliwość na ból, leki przeciwbólowe czy stres jest bardzo zróżnicowana zarówno u ludzi jak i u zwierząt (Mogil J.S. i wsp.1996; Roger

D. 1998; Faraday M.M. 2002). W warunkach stresu czy też silnych przeżyć emocjonalnych obniża się podatność na ból np. u rannych w wypadkach, u żołnierzy w czasie walki czy też podczas zawodów sportowych. Zjawisko to nosi nazwę analgezji wywołanej stresem. Zwierzęcym modelem charakteryzującym się zróżnicowaną wrażliwością na stres i ból są linie myszy selekcyonowane w kierunku niskiej (LA) i wysokiej (HA) analgezji postresowej wywołanej pływaniami (Panocka I. i wsp.1986a; Panocka I. i wsp.1986b). Przeprowadzone badania wykazały, że hipotermia spowodowana pływaniami w zimnej wodzie ma istotne znaczenie stresogenne, ale wykazano także ważną rolę czynnika emocjonalnego związanego z groźbą utonięcia (Łapo I.B. i wsp. 2003).

Analgezja wywołana stresem zależy głównie od endorfin, które powstają z tego samego białkowego prekursora co adrenokortykotropina - proopiomelanokortyny (Osawa T. i wsp. 1998). Neurony układu miejscowego/ noradrenalina a także neurony wydzielające CRH/wazopresyna argininowa unerwiają i są unerwiane przez neurony produkujące peptydy opioidowe w jądrze łukowatym podwzgórza. Sytuacja stresowa stymuluje podwzgórzowe pochodne POMC takie jak  $\beta$ - endorfiny, które hamują aktywność obydwu komponentów centralnych układu stresu, wywołują analgezję poprzez projekcje do tyłomózgowia i rdzenia kręgowego, gdzie hamują wstępujące drogi przewodzenia bólu (Matter R.L. i wsp. 2000).

$\beta$ -endorfina jest 31-aminokwasowym peptydem opioidowym (Bach F.W. i wsp. 1995) i zawiera sekwencję pięciu aminokwasów Tyr-Gly-Gly-Phe-Met na N-końcu łańcucha aminokwasowego, który jest odpowiedzialny za jej właściwości analgetyczne i euforyczne (Ryc.4). Ludzka  $\beta$ -endorfina różni się od  $\beta$ -endorfiny pozostałych ssaków C- końcowym fragmentem a także aminokwasem w pozycji 27 łańcucha aminokwasowego. (Smith M.E.2006).

A. Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu

B. Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-His-Lys-Lys-Gly-Gln

Ryc. 4. Sekwencja aminokwasowa  $\beta$ -endorfiny u (A) człowieka i (B) bydła, wielbłąda i owcy. Podkreślono różnice w podstawieniu aminokwasów (Smith M.E. 2006).

Największe stężenie  $\beta$ -endorfin występuje w jądrze łukowatym podwzgórza. Neurony jądra łukowatego wykazują projekcję do jądra półleżącego istoty szarej okołowodociągowej oraz jądra migdałowatego. Większość miejsc wykazujących ekspresję  $\beta$ -endorfin zaangażowanych jest w proces odpowiedzi na ból.  $\beta$ -endorfiny obecne są także w takich strukturach jak wyniosłość pośrodkowa, wzgórze, śródmózgowie, hipokamp, jądro pasma samotnego (*nucleus tractus solitarius of the caudal medulla*), rdzeń kręgowy. W tkankach obwodowych,  $\beta$ -endorfiny występują w przewodzie pokarmowym, trzustce, korze nadnerczy, mięśniach szkieletowych oraz w skórze.

W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że  $\beta$ -endorfina jest nieselektywnym agonistą receptorów opioidowych i wywołuje swój efekt poprzez wiązanie lub stymulację receptorów  $\epsilon$ , *mu*, *delta*, *kappa*, do których wykazuje różne powinowactwo. Wykazano, że  $\beta$ -endorfiny aktywują receptory opioidowe (*mu*, *delta*) na obwodowych zakończeniach nerwów aferentnych w tkankach w stanie zapalnym, wykazując właściwości

antynocyceptywne, a stan zapalny zwiększa ich aktywność. Na poziomie rdzeniowym,  $\beta$ -endorfiny wywołują analgezję poprzez receptory *kappa* i *mu*. Na poziomie mózgowym,  $\beta$ -endorfiny wywołują analgezję wiążąc się z receptorem  $\epsilon$  w mózgu, a tym samym wpływają na wydzielanie Met-enkefalin w rdzeniu kręgowym, które działają poprzez receptor *delta 2* w rdzeniu kręgowym (Tseng L.F. 2001).

$\beta$ -endorfiny, po podaniu dokomorowym (*icv.*), dordzeniowym (*i.t.*) i podpajęczynówkowy (*epidural*-nadoponowy) wywołują długotrwałą analgezję, która jest znoszona po podaniu antagonisty naloksonu. Po podaniu dożylnym nie wykazują jednak efektu przeciwbólowego, co wiąże się z brakiem możliwości w przechodzeniu przez barierę krew-mózg (Sheps D. i wsp. 1995). Główną rolę w analgezji wywołanej przez  $\beta$ -endorfiny odgrywa jądro łukowate w podwzgórzu (Pertovaara A. i wsp. 2006). Uszkodzenie tego miejsca podobnie jak uszkodzenia jądra przykomorowego (*paraventricular nucleus*) (Truesdel L.S. i wsp. 1987) znacznie osłabia analgezję postresową oraz redukuje efekt antynocyceptywny wywołany przez elektryczną stymulację PAG. (Smith M.E. 2006; Millan M.J. i wsp. 1980).

Zaobserwowano, że w wyniku drażnienia kończyn u szczura, wysiłku fizycznego (Carr D.B. i wsp. 1981) czy stresu wynikającego z publicznych wystąpień u ludzi (Sheps D. i wsp. 1995), poziom adrenokortykotropiny i  $\beta$ -endorfin w przednim płacie przysadki obniża się o 40- 50%. Wzrost poziomu tych peptydów zaobserwowano natomiast w osoczu co wskazuje, że krążenie ogólne jest pierwszym miejscem do którego są uwalniane endorfiny (Zangen A. i wsp. 1998). Efekt ten zostaje zniesiony po usunięciu przysadki oraz poprzez podanie deksametazonu, który hamuje wydzielanie kortykoliberyny (Bodnar R.J. i wsp. 1979; Terman G.W. i wsp. 1984).

Stres może uaktywniać układ opioidowy poprzez wydzielanie peptydów opioidowych na poziomie rdzenia kręgowego, ale także na wyższych piętrach ośrodkowego układu nerwowego. Zastosowanie doświadczalnych stresorów takich jak elektryczne drażnienie kończyn, wibracje, ekstremalna temperatura wywołują analgezję, która w zależności

od warunków może być opioidowa, nieopiodowa lub mieć charakter mieszany w którym udział bierze zarówno komponent opioidowy i nieopiodowy. Stres wynikający z pozbawienia jedzenia i wody (Cooper S.J. 1980) oraz wymuszone pływanie w zimnej wodzie wywołują analgezję (Terenius L. 1992). Badania wykazały również, że gryzonie, które w naturalnych warunkach żyją w dużych populacjach, w izolacji są bardziej podatne na działanie stresorów (Bartolomucci A i wsp. 2003). Jednakże o charakterze analgezji wywołanej stresem decyduje rodzaj zastosowanego stresora, jego intensywność, czas trwania oraz w dużej mierze miejsce drażnienia (Watkins L.R. i wsp. 1982). O charakterze analgezji wywołanej pływaniami decyduje zarówno temperatura wody jak i czas pływania (Cooper K. i wsp. 1982). W przypadku zastosowania stresora w postaci elektrycznego drażnienia kończyn, intensywność, częstotliwość a także region ciała poddany drażnieniu decyduje o tym, który komponent - opioidowy czy też nieopiodowy, zostanie zaangażowany w proces analgezji (Panocka I. i wsp. 1986; Sadowski B. i wsp. 1999). Przeważnie łagodne stresory n.p. pływanie w ciepłej wodzie wywołują u myszy i szczurów analgezję opioidową, a silne stresory takie jak pływanie w zimnej wodzie sprzyjają powstawaniu analgezji nieopiodowej (Terman G.W. i wsp. 1983).

### **3. Bariera krew- mózg**

W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się zmianom morfologicznym w mózgu, związanym z działaniem czynników stresowych oraz nadmierną aktywacją osi HPA. W badaniach na gryzoniach wykazano, że bodźce stresowe, szczególnie działające długotrwale, wywołują atrofię komórek piramidowych w hipokampie i zmniejszają oporność na inne czynniki uszkodzające takie jak niedotlenienie czy hipoglikemia. Zaburzenia te mają wyraźny związek z chronicznym pobudzeniem układu HPA, a w konsekwencji nadmiernym oddziaływaniem glikokortykosteroidów na układy neuronalne. Narażenie zwierząt laboratoryjnych we wczesnym okresie życia na bodźce stresowe (Sternberg W.F. i wsp. 2003) prowadzi do trwałych

zmian w aktywności układu HPA i zaburzeń w funkcjonowaniu układów noradrenergicznego i serotoninergetycznego (Kostowski W. 2004).

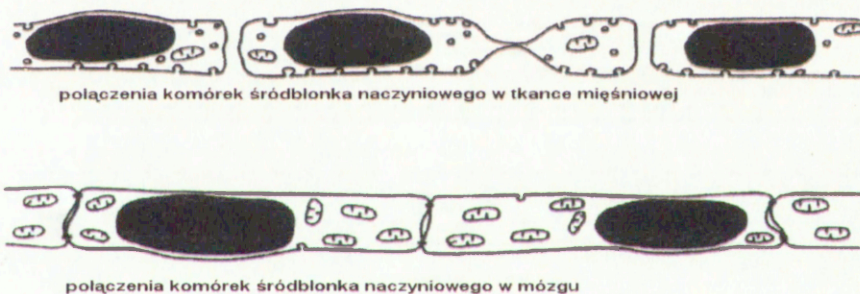
Badania ostatnich lat wykazały, że czynniki stresowe mogą wpływać także na zwiększenie przepuszczalności bariery krew- mózg dla związków i substancji, dla których w warunkach fizjologicznych bariera ta jest nieprzepuszczalna (De Lange E.C.M. i wsp. 1995; Skultetyova I. i wsp. 1998). Stresory takie jak unieruchomienie przez 4- 8 godz., podwyższona temperatura, długotrwała hipoglikemia lub głodzenie prowadzą do naruszenia integralności bariery krew- mózg. Ponadto wykazano, że krótkotrwały (30 min.) stres wynikający z unieruchomienia, zwiększa przepuszczalność bariery krew- mózg w okolicy podwzgórza. Podobne zmiany zaobserwowano po 30 min. wymuszonym pływaniu (Belova T.I. i wsp. 1992; Oztas B. i wsp. 1985).

Mechanizm odpowiedzialny za zmiany w przepuszczalności bariery krew- mózg spowodowane stresem nie jest do końca poznany, jednakże uważa się, że jednym z czynników wywołujących te zmiany jest ostre podwyższenie ciśnienia tętniczego krwi u stresowanych zwierząt (Johansson B.B. i wsp. 1970).

### **3.1. Budowa i funkcje bariery krew- mózg**

Wiele barwników na przykład błękit metylenowy, wstrzykniętych zwierzęciu dożylnie zabarwia wszystkie narządy z wyjątkiem ośrodkowego układu nerwowego (Saunders N.R. i wsp. 2008). Dało to podstawę do stworzenia pojęcia bariery krew- mózg, która jest specyfiką krążenia mózgowego, odpowiedzialną za utrzymanie homeostazy mózgu (Wolburg H. i wsp. 2002). Mózg jest oddzielony od krwioobiegu poprzez dwie bariery: barierę krew- mózg (BBB) i barierę krew- płyn mózgowo- rdzeniowy (BCSFB), zlokalizowaną w splocie naczyniówkowym (*choroid plexus*) (Scherrmann J.M. 2002). Bariera krew- mózg jest zarówno barierą fizyczną, wynikającą ze struktury komórek tworzących barierę, jak i barierą

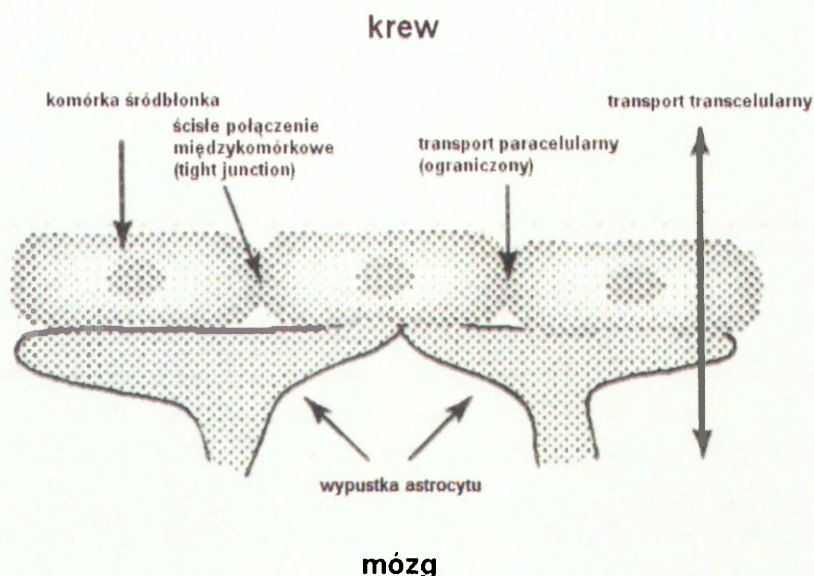
biochemiczną, obejmującą procesy biochemiczne zachodzące w obrębie cytoplazmy komórek tworzących barierę. Dla przeciętnego mózgu ludzkiego ważącego 1300g, powierzchnia bariery krew- mózg wynosi ok.  $20\text{m}^2$  (Lc E.H. i wsp. 2001). Bariera krew- mózg jest barierą pomiędzy naczyniami krwionośnymi a tkanką nerwową, zabezpieczającą układ nerwowy przed szkodliwymi czynnikami oraz umożliwiającą selektywny transport substancji z krwi do płynu mózgowo- rdzeniowego (Witt K.A. i wsp. 2001). W większości narządów między sąsiadującymi komórkami śródbłonka znajdują się przerwy, przez które rozpuszczone we krwi związki mogą swobodnie przechodzić do płynu śródmiąższowego tkanek. Przenikalność bariery krew- mózg jest uwarunkowana odmienną budową śródbłonka naczyń włosowatych, które połączone są ze sobą poprzez tzw. strefy zamykające (Rascher G. i wsp. 2000) (Ryc.5).



Ryc.5. Różnice w połączeniach komórek śródbłonka naczyniowego w tkance mięśniowej i mózgu (Paulson O.B. 2002)

W związku z tym, że strefy te są ścisłymi złączami między komórkami, nie posiadają szczelin, porów ani okienek, substancje obecne w osoczu mogą pokonywać barierę śródbłonka jedynie na drodze transportu transcelularnego. Ścisłe połączenia międzykomórkowe ograniczają więc transport paracelularny, uniemożliwiając substancjom hydrofilowym przechodzenie przez barierę (Ryc.6).





Ryc. 6. Budowa bariery krew- mózg z uwzględnieniem rodzajów transportu (Kusuhara H. i wsp. 2001).

Małe substancje lipofilne takie jak tlen i dwutlenek węgla dyfundują wolno przez błony komórkowe według gradientu stężeń (Grieb P. i wsp. 1985; Ballabh P. i wsp. 2004; Paulson O.B. 2002). Komórki śródbłonna wykazują dużą aktywność metaboliczną, zawierają liczne mitochondria, ale nie występuje w nich proces pinocytozy. Transport przezkomórkowy opiera się na dwóch systemach transportu: dyfuzji i transportu czynnego z udziałem białek błonowych- nośników (Egleton R.D. i wsp. 1997). Na drodze dyfuzji transportowane są głównie drobnocząsteczkowe substancje odżywcze i substancje rozpuszczalne w tłuszczach. Peptydy i białka regulacyjne np. oksytocyna, opiaty, insulina, glukagon, somatostatyna i inne korzystają z transportu komórkowego opartego na transporcie czynnym z udziałem nośników białkowych (Scherrmann J.M 2002). Substancje transportowane na drodze transcytozy nie są przekazywane bezpośrednio do neuronów, tylko do wypustek komórek glijowych- astrocytów. Pokrywają one około 90% powierzchni ścian naczyń włosowatych i są łącznikami pomiędzy ścianą

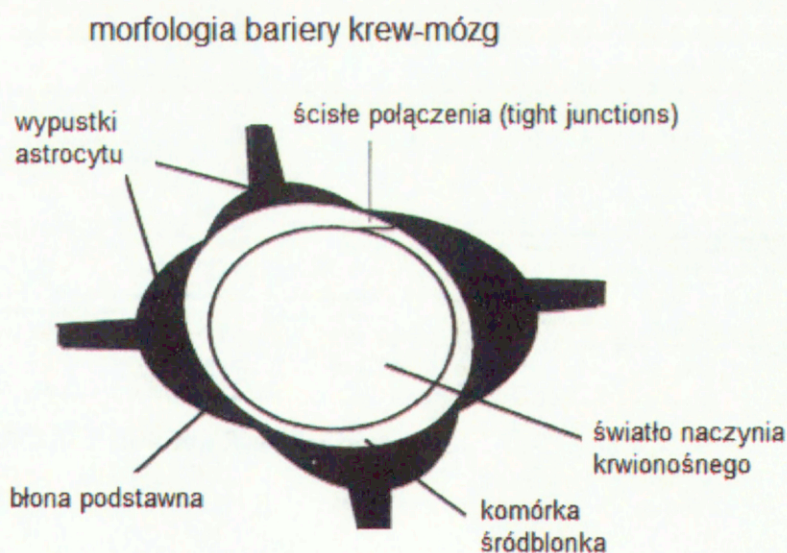
naczynia włosowatego a neuronami. Jedną z wypustek wykształconą w postaci stopki astrocyt dotyka do powierzchni naczynia włosowatego, innymi wypustkami nawiązuje kontakt z sąsiednimi neuronami (Ryc.7). Astrocyty transportują substancje zarówno z naczynia do neuronów, jak i z neuronów do naczynia. Poza tym astrocyty pełnią rolę ochronną bariery krew- mózg podczas niedotlenienia narządów i tkanek i aglikemii (Abbruscato T.J. i wsp. 1999).

Funkcja biochemiczna bariery krew- mózg związana jest ze zdolnością do metabolizowania pewnych związków w obrębie cytoplazmy komórek śródbłonowych i astrocytów np. adrenalina i dopamina są inaktywowane przez obecny w cytoplazmie enzym MAO (monoaminooksydaza) (Egieton R.D. i wsp. 2005, Egieton R.D. i wsp. 1997). Inaktywacja katecholamin (adrenalina, serotonina, dopamina) ma na celu ochronę neuronów przed chwilowymi wzrostami stężenia katecholamin, pojawiających się w osoczu na skutek pobudzenia układu współczulnego np. w wyniku stresu bądź strachu.

Bariera krew- mózg obecna jest we wszystkich regionach mózgu z wyjątkiem naczyń okolic okołokomorowych. W tych miejscach naczynia krwionośne posiadają okienka pozwalające na dyfuzję molekuł znajdujących się we krwi przez ścianę naczynia. Szczelność bariery krew- mózg jest słaba w rejonie tylnego płata przysadki mózgowej oraz w okolicach splotu naczyniówkowego. Bariera ta nie występuje w sensie fizjologicznym w narządzie naczyniowym białki krańcowej. Miejsca mózgu, w których bariera krew- mózg jest rozszczelniona umożliwiają regulację autonomicznego systemu nerwowego i prawidłowe funkcjonowanie gruczołów wydzielania wewnętrznego (Ballabh P. i wsp. 2004).

Bariera krew- mózg nie dopuszcza do wolnej dyfuzji jakichkolwiek substancji zawartych we krwi do przestrzeni śródmiąższowej mózgu (Kusuhara H. i wsp. 2001). Komórki śródbłonkowe, ściśle związane kompleksami łącznikowymi, spełniają krytyczną rolę w podstawowych procesach biologicznych, jak transport mikro- i makroskładników odżywczych, sygnalizacji działającej za pośrednictwem receptorów,

kierowania ruchem leukocytów i regulacji osmotycznej. Szereg białek cząsteczkowych, odpowiedzialnych za niektóre z ww. czynności zostały już wyodrębnione. Są to białka uczestniczące w tworzeniu i powstawaniu ścisłych połączeń między komórkami, pogrążone w błonie komórkowej białka osocza, odpowiedzialne za transport do mózgu substratów energetycznych i substancji odżywczych, białka transportujące wiele leków, p- glikoproteiny i inne białka, które dzięki swym właściwościom odpychania pewnych leków stanowią ochronę mózgu przed obcymi substancjami chemicznymi (Furuse M. i wsp. 1993; Furuse M. i wsp. 1998, Furuse M. i wsp. 1998; Balda M.S. i wsp. 2000). Wynika z tego, że śródbłonek naczyń mózgowych jest złożonym i dynamicznym układem biologicznym, nie zaś bierną barierą. Bariera krew- mózg działa jak błona półprzepuszczalna i jest urządzeniem osmometrycznym. Płyny hipotoniczne np. roztwór Hartmanna, prowadzą do zwiększenia zawartości wody w mózgu.



Ryc. 7. Morfologia bariery krew- mózg (Egleton R.D. i wsp. 1997).

### 3.2. Zmiany patologiczne w strukturze bariery krew- mózg

Przerwanie ścisłych połączeń komórkowych (*tight junction*) bariery krew- mózg jest wyznacznikiem wielu zmian patologicznych w ośrodkowym

układzie nerwowym takich jak: udar, HIV, zapalenie mózgu, choroba Alzheimera, stwardnienie rozsiane i zapalenie opon mózgowych. Ponadto wykazano, że stan zapalny powoduje przerwanie ścisłych połączeń komórkowych i wzrost przepuszczalności między komórkami (Huber J.D. i wsp. 2001). W chorobach zapalnych takich jak stwardnienie rozsiane- postać rzutowa, obserwuje się ciągłe dysfunkcje bariery krew- mózg, natomiast w modelach eksperymentalnych, wszelkie zmiany neurologiczne poprzedzane są zmianami w funkcjonowaniu tejże bariery (Sun D. 2000). W chorobie Alzheimera,  $\beta$ - amyloid powoduje uwolnienie cytokin i migrację monocytów przez barierę krew- mózg w badaniach *in vitro*, natomiast w badaniach *in vivo* pokłady  $\beta$ - amyloidu prowadzą do zaburzenia w unaczynieniu błony podstawnej i zmian w przepuszczalności bariery krew- mózg. Wiele z tych zmian jest związanych ze zmianami w połączeniach komórkowych bariery krew- mózg (Berzin T.M. 2000).

W normalnym, zdrowym mózgu, wysoko wyspecjalizowane komórki endotelialne ograniczają napływ leukocytów do mózgu. We wspomnianych wcześniej chorobach neurologicznych, naruszenie integralności bariery krew- mózg prowadzi do migracji leukocytów do mózgu (Lou J. i wsp. 1997; Minagar A. i wsp. 2002). Wykazano, że napływ leukocytów do mózgu uwalnia kaskadę przewodzenia sygnału, prowadząc do utraty molekuł wchodzących w skład połączeń komórkowych t.j okcludyny i zonuli okcludyny a w konsekwencji do przerwania ciągłości bariery krew- mózg (Bolton S.J. i wsp. 1998). Astrocyty i mikroglej chronią ośrodkowy układ nerwowy ale w warunkach patologicznych mogą zwiększać stan zapalny i pośrednio prowadzić do śmierci komórek. Interakcje pomiędzy astrocytami, mikroglejem a układem odpornościowym prowadzą do zmienionej produkcji neurotoksyn, odgrywających rolę w patogenezie takich chorób jak HIV czy stwardnienie rozsiane (Minagar A. i wsp. 2002).

Widoczną cechą ostrego uszkodzenia mózgu jest obrzęk. Badania *in vivo* wykazały, że hypoksja/ ischemia wywołuje uszkodzenia bariery krew- mózg, zwiększając jej przepuszczalność i doprowadzając do obrzęku mózgu (Lai

C.H. i wsp. 2005; Strbian D. i wsp. 2008). Obrzęk może, w szerokiej klasyfikacji być zarówno pochodzenia cytotoksycznego i ub naczyńowego (Kimelberg H.K. i wsp. 1995). Obrzęk pochodzenia cytotoksycznego obejmuje „puchnięcie” komórek mózgowych t.j. neuronów i astrocytów. Jednym z proponowanych mechanizmów jest uszkodzenie pompy jonowej oraz osmotyczna akumulacja wewnątrzkomórkowej wody. Do powstania obrzęku naczyńowego przyczynia się osmotyczny gradient powstały pomiędzy parenchymą mózgu a naczyniami krwionośnymi i związany jest on albo z gradientem jonowym albo z białkami osocza, które przeszły przez uszkodzoną barierę krew- mózg (Verlooy T J. i wsp. 2005).

Pomimo tego, że struktura bariery krew- mózg została w miarę dobrze poznana, znana jest struktura połączeń międzykomórkowych a także czynniki wpływające na charakter bariery krew- mózg, wiedza na temat mechanizmów komórkowych zachodzących w stanach chorobowych jest bardzo ograniczona. Spowodowane jest to brakiem odpowiedniego modelu zwierzęcego, który mógłby odwzorować patologię mózgu ludzkiego.

#### 4. Hipoteza i cel pracy

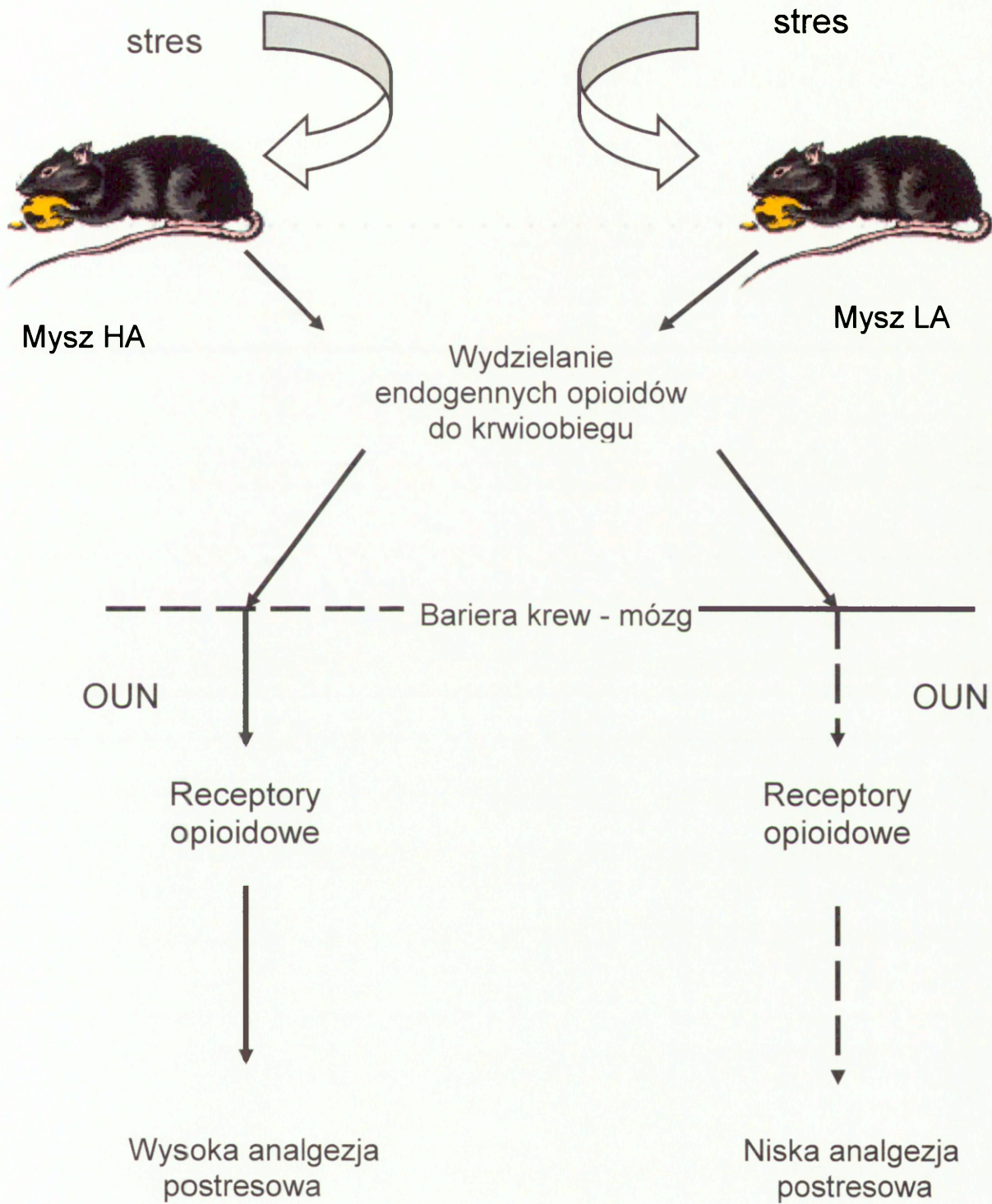
Indywidualne różnice reakcji na stres oraz ból obserwuje się zarówno u ludzi jak i u zwierząt doświadczalnych. Jednym z interesujących fenomenów jest występowanie analgezji wywołanej przez stres (ang. *stress induced analgesia*). Ponad trzydzieści lat temu prof. Bogdan Sadowski z Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt w Jastrzębcu, poprzez odpowiednią selekcję myszy Swiss Webster wyodrębnił dwie linie zwierząt o różnej odpowiedzi przeciwbólowej na stres (pływania). U zwierząt linii HA (*high analgesia*- linia wysokoanalgetyczna) stres pływania indukował silną analgezję na ostry ból termiczny, natomiast u zwierząt linii LA (*low analgesia*- linia niskoanalgetyczna) analgezja postresowa była minimalna.

Ponieważ wysoka analgezja postresowa myszy linii HA jest częściowo odwracalna naloksonem natomiast linia LA wykazuje bardzo niską analgezję, która jest niewrażliwa na nalokson (Mogi J.S. i wsp. 1996), w endogennym układzie opioidowym poszukiwano różnic pomiędzy dwoma liniami zwierząt. Jednakże wieloletnie badania nie wykazały przyczyn mogących tłumaczyć duże różnice w odpowiedzi analgetycznej na stres. Nasz zespół postawił hipotezę, że różnice pomiędzy liniami HA i LA są wynikiem różnic w przepuszczalności bariery krew- mózg dla endogennych peptydów (enkefalin, endorfin) wydzielanych do krwioobiegu w czasie stresu (Ryc.8).

Bariera krew-mózg stanowi bardzo skuteczną ochronę ośrodkowego układu nerwowego przed peptydami występującymi w krwioobiegu, w tym endogennych lub egzogennie podawanych peptydów opioidowych. Jednakże konsekwencją patologicznych zmian bariery krew-mózg może być zwiększona jej przepuszczalność. Między innymi, badania naszego zespołu wykazały zwiększenie przepuszczalności bariery krew-mózg na peptydy opioidowe u zwierząt z wywołanym zapaleniem ośrodkowego układu nerwowego.

Celem podjętych badań w ramach pracy doktorskiej była analiza analgetycznego działania opioidowych analogów peptydowych u linii HA i LA. Założono, że uzyskane dane dostarczą argumentów za lub przeciw

postawionej hipotezie o roli bariery krew- mózg w różnej odpowiedzi na stres u linii HA i LA.



Ryc. 8. Hipoteza pracy.



II  
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

## 5. Charakterystyka materiału doświadczalnego

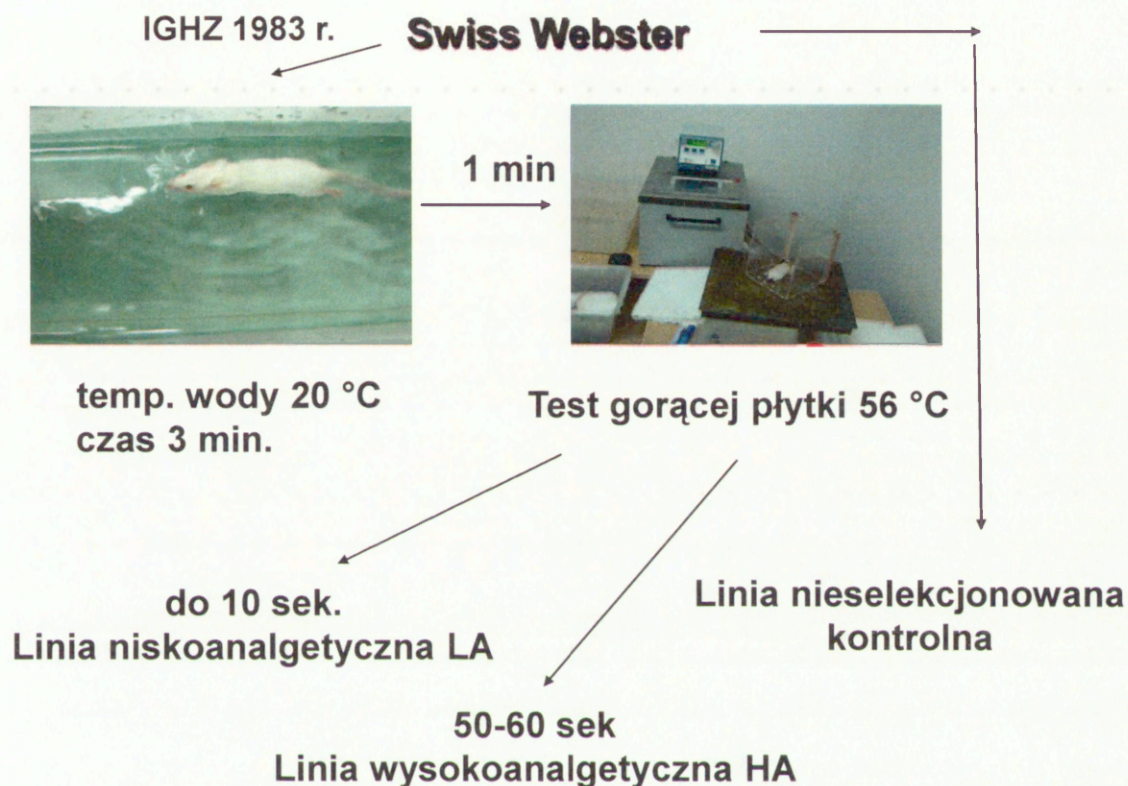
### 5.1 Zwierzęta

Badania opisane w pracy zostały przeprowadzone na myszach Swiss Webster, należących od 65 do 70 pokolenia zwierząt selekcjonowanych w kierunku wysokiej i niskiej analgezji postresowej. Selekcja została rozpoczęta w 1983 roku w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt w Jastrzębcu i jest kontynuowana.

Myszy należące do populacji niespokrewnionej, zmuszono do pływania przez 3 minuty w wodzie o temp. 20°C, a następnie umieszczano w czystej klatce na 1 min. w celu wysuszenia sierści. Zarówno przed jak i po pływaniu badano ich odruchy w teście gorącej płytki. Mysz umieszczano w cylindrze z pleksiglasu o średnicy 15 cm ustawionym na metalowej płytce o temperaturze 56°C. Czas upływający od momentu postawienia zwierzęcia na płytce do wystąpienia charakterystycznych odruchów otrząsania lub lizania kończyn mierzony był stoperem. Czas ten przyjmowano jako latencję (okres utajony) reakcji bólowej. Natychmiast po wystąpieniu reakcji zwierzę zdejmowano z płytki. Maksymalny czas przebywania na płytce został ograniczony do 60 sekund aby uniknąć oparzeń w przypadku braku reakcji. Do dalszych kojarzeń wybierano zwierzęta wykazujące najkrótsze (do 10 sek.) i najdłuższe (50- 60 sek.) latencje w teście gorącej płytki. Początek linii niskoanalgetycznej (LA- od ang. *Low analgesia*) dały myszy wykazujące najkrótsze latencje. Myszy wykazujące najdłuższe latencje dały początek linii wysokoanalgetycznej (od ang. *High analgesia*) (Ryc.9).

Powyższa procedura powtarzana była w każdym pokoleniu potomnym, unikając kojarzenia zwierząt pochodzących z tego samego miotu aby zmniejszyć wsobność. Jednocześnie prowadzono hodowlę linii

nieselekcjonowanej tzw. kontrolnej (K), stosując kojarzenia losowe. W ciągu roku uzyskiwano do 3- 4 pokoleń (Panocka l. i wsp., 1996).



Ryc. 9. Uproszczony schemat selekcji myszy Swiss Webster w kierunku wysokiej i niskiej analgezji postresowej.

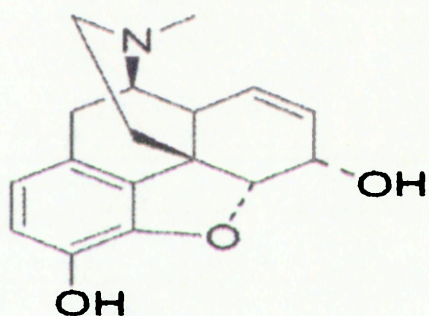
## 5.2 Związki opioidowe

Peptydy opioidowe podawane bezpośrednio do ośrodkowego układu nerwowego (*i.t.* lub *i.c.v.*) wykazują silne działanie przeciwbólowe. Niestety po podaniu obwodowym ich aktywność obniża się znacznie, głównie w wyniku trudności z przechodzeniem przez barierę krew-mózg (Egleton R.D., Davis T.P.1997). W doświadczeniach użyto związki opioidowe: peptydowe i niepeptydowe, w różnym stopniu przechodzące przez barierę krew- mózg.

Znane właściwości farmakologiczne tych związków miały wykazać możliwe istnienie różnic w przepuszczalności bariery krew- mózg u selekcyonowanych linii myszy na podstawie uzyskanego efektu analgetycznego.

### 5.2.1. Morfina

Większość narkotycznych leków przeciwbólowych to alkaloidy opium lub ich pochodne. Opium jest stężonym sokiem z niedojrzałych makówek maku ogrodowego (*Papaver somniferum*). Znajdują się w nim dwa rodzaje alkaloidów, różniących się zasadniczo właściwościami farmakologicznymi. Są to alkaloidy fenantrenowe (morfina, kodeina, tebaina) oraz alkaloidy benzyloizochinolinowe (papaweryna, narkotyna). Zastosowanie kliniczne ma morfina (Ryc.9), kodeina i papaweryna.



Ryc. 10. Struktura chemiczna cząsteczki morfiny.

Morfina i jej pochodne wywierają działanie łącząc się z receptorami opioidowymi, głównie podtypu *mu*. W następstwie pobudzenia receptorów opioidowych dochodzi do zmian wewnątrzkomórkowych stężeń cyklicznych nukleotydów. Morfina hamuje aktywność pobudzanej przez prostaglandyny cykazy adenylicznej czym tłumaczy się obniżanie przez nią temperatury ciała po podaniu ogólnym. Z działań ośrodkowych najważniejsze jest działanie przeciwbólowe morfiny, występujące po dawkach nie wpływających na inne doznania zmysłowe (czucie dotyku, percepcja bodźców wzrokowych i słuchowych), a nasilenie działania przeciwbólowego jest proporcjonalne do zastosowanej dawki. Morfina znosi bóle tępe, przewlekłe n.p. nowotworowe, natomiast w bólu ostrym konieczne są większe dawki leku. Istotne jest to, że

morfina łagodzi emocje (lęk, poczucie zagrożenia, strach) towarzyszące doznaniom bólowym. Morfina i pozostałe opioidy wpływają także na wydzielanie dokrewne osi przysadka – podwzgórze. Wpływ na wydzielanie ACTH jest złożony: morfina hamuje wydzielanie ACTH pod wpływem czynników stresowych, natomiast w czasie wymiotów wywołanych podaniem opioidów wydzielanie ACTH jest nasilone.

Morfina wchłania się łatwo z przewodu pokarmowego, tkanki podskórnej, mięśniowej, błony śluzowej nosa i płuc. Po wchłonięciu do krwi łatwo przenika niema do wszystkich tkanek i narządów. Wchłanianie się morfiny z przewodu pokarmowego zależy od stężenia wolnego leku zarówno w świetle jelita, jak i we krwi docierającej do kosmków jelitowych. Szybkość występowania działania przeciwbólowego i czas jego utrzymywania się zależą od drogi podania. Morfina podawana w standardowej dawce 10 mg wykazuje u ludzi maksymalny efekt przeciwbólowy 30 min. po podaniu dożylnym i po 60- 90 min. po podaniu domięśniowym i podskórnym. Efekt przeciwbólowy utrzymuje się przez ok. 3- 4 godz. po podaniu dożylnym i 4- 5 godz. po podaniu podskórnym. Innymi drogami podania morfiny, stosowanymi w leczeniu są wstrzyknięcia podpajęczynówkowe i nadtwardówkowe. W tych przypadkach dawki morfiny są o wiele mniejsze a czas działania przeciwbólowego dłuższy (Kostowski W. red. 1998, 2001)

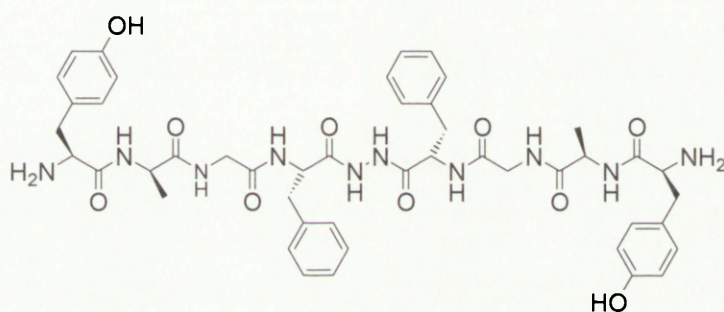
Po kilkakrotnym zastosowaniu dawek leczniczych występuje zjawisko tolerancji, co oznacza konieczność zwiększenia dawek w celu uzyskania tego samego efektu przeciwbólowego. Kilkakrotne podanie morfiny powoduje również powstanie uzależnienia fizycznego i psychicznego. Nagłe zaprzestanie stosowania morfiny prowadzi do wystąpienia objawów abstynencji w postaci bezsenności, lęku, niepokoju, rozdrażnienia zawrotów głowy, braku łaknienia, drżeń mięśniowych, potów, biegunki, zaburzeń naczyniowo- sercowych (Danysz A., Kieinrok Z. red. 1987).

Morfina często wywołuje nudności, wymioty, zaparcia, zawroty głowy, zaburzenie czynności umysłowych, wzrost ciśnienia w drogach żółciowych.

Rzadko wywołuje odczyny uczuleniowe w postaci pokrzywki lub wstrząs anafilaktyczny (Danysz A., Kleinrok Z. red. 1996).

### 5.2.2. Bifalina

Bifalina jest peptydem składającym się z 8 aminokwasów. Jest syntetycznym analogiem endogennych enkefalin Met- i Leu – enkefaliny (Lipkowski A.W. i wsp., 1982).



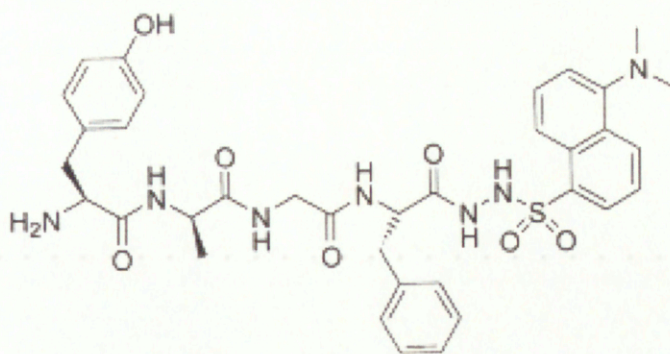
Ryc. 11. Struktura chemiczna cząsteczki bifaliny.

Bifalina jest dimerycznym tetrapeptydem, w którym dwa tetrapeptydowe farmakofory enkefalinowe są połączone wg układu "głowa-do-głowy" mostkiem hydrazydowym (Ryc.11). Dzięki takiej strukturze obydwa fragmenty farmakoforowe są zdolne do oddziaływania z receptorami opioidowymi, a sztywny układ mostku hydrazydowego zapobiega wewnętrznej agregacji zhybrydowanych peptydów (Lipkowski A.W.i wsp., 1982; Lipkowski A.W. i wsp., 1987; Stępiński J.i wsp.,1991; Lipkowski A.W. i wsp. 1999). Peptydazy poprzez jednostronne oddziaływanie na cząsteczkę bifaliny, prowadzą do powstania fragmentów z zachowaniem aktywności (Lipkowski A.W.i wsp.,1994). Badania nad fragmentami i analogami bifaliny wskazują, że obecność reszty fenyloalaniny (lub innego elementu "po drugiej stronie mostka hydrazydowego") determinuje wysokie powinowactwo do receptorów *mu* i *delta* (Horan P. i wsp.,1993; Misicka A. i wsp., 1997; Abbruscato T.J. i wsp.,1996; Silbert B.S., 1990). W wyniku

przeprowadzonych badań wykazano, że działanie bifaliny zależy w dużej mierze od drogi podania (Konecka A.M. i wsp., 1987; Misterek K. i wsp., 1994). Najsilniejsze działanie wykazuje po podaniu podjęczynówkowym a najsłabsze po podaniu podskórnym (Horan P.J. i wsp., 1993; Siibert B.S. i wsp., 1991; Kamei J. i wsp., 1988). Bifalina podawana dożylnie wywołuje anaigezę porównywalną do morfiny, natomiast podawana podjęczynówkowo lub dokomorowo jest 100- 1000- krotnie bardziej aktywna niż morfina.

### 5.2.3. AA2016

Badania nad aktywnością i strukturą bifaliny wykazały, że pełna dimeryczna sekwencja bifaliny nie jest wymagana aby zachować jej aktywność biologiczną. Wyeliminowanie tripeptydu z jednego „ramienia” bifaliny nie zmniejsza znacząco jej aktywności (Lipkowski A.W. i wsp. 1999). Fenyloalanina może zostać zastąpiona zarówno przez aminokwasy lipofilne jak i inne elementy lipofilne (Maszczyńska I. i wsp. 1998). Zrodziła się więc idea zastąpienia fenyloalaniny siłą grupą fluorescencyjną. Umożliwiło to badanie metabolizmu związku w żywym organizmie a także pomogło w badaniu jego dystrybucji w organizmie. Peptydy fluorescencyjne są dobrymi narzędziami w badaniu mechanizmu tworzenia się kompleksu peptyd-receptor (Turcatti G. i wsp. 1998; Gaudriault G. i wsp. 1998). AA2016 jest analogiem bifaliny, w którym fenyloalanina została zastąpiona dansyiem (DNS) (Ryc.12). Związek ten w świetle UV o długości fali 254 nm wykazuje żółtą fluorescencję. Podobnie jak bifalina wykazuje wysokie powinowactwo do receptorów *mu* i *delta*.



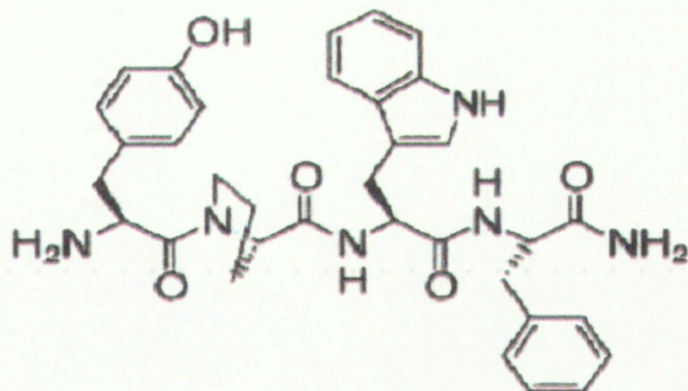
Ryc. 12. Struktura chemiczna cząsteczki AA2016.

Wysokie powinowactwo AA2016 do receptorów opioidowych jest silnie skorelowane z jego aktywnością przeciwbólową. Po podaniu podjęczynówkowym wykazuje efekt antynocyceptywny podobny do efektu jaki daje bialina (Abbruscato T.J. i wsp. 1996). Zwiększenie dawki prowadzi zarówno do zwiększenia poziomu analgezji jak i przedłużenia czasu jej trwania. Związek podawany podjęczynówkowo w dużych dawkach tj. 1.0 nmo wywołuje analgezję długotrwałą, odwracalną, bez skutków ubocznych takich jak katalepsja czy depresja oddechowa (Lipkowski A.W. i wsp. 2002).

#### 5.2.4. Endomorfina-1

Endomorfiny są endogennymi peptydami opioidowymi odkrytymi przez Zadina w 1997. Wyizolowane z mózgu ssaka dwa tetrapeptydy zostały nazwane endomorfina- 1 (EM-1) i endomorfina – 2 (EM-2) i zidentyfikowano je jako endogenne ligandy receptora *mu* (Zadina J.E. i wsp. 1997).





Ryc. 13. Struktura chemiczna cząsteczki Endomorfiny- 1.

Pomimo, że EM- 1 jak i EM- 2 są obecne w centralnym układzie nerwowym i tkankach odpowiedzi immunologicznej, wykazano istnienie pewnych różnic co do ich rozmieszczenia w organizmie żywym. Głównym miejscem występowania EM-1 jest mózg natomiast główną cechą charakteryzującą EM są właściwości przeciwbólowe. Zarówno po podaniu podpajęczynówkowym (*i.t.*) jak i dokomorowym (*i.c.v.*) peptydy te wykazują silne działanie przeciwbólowe podobne do efektu morfiny (Zadina J.E. i wsp.1997; Coventry T.L. i wsp. 2001). Wykazano, że peptydy te wywołują antynocycępcję u gryzoni w różnych modelach bólu np. bó ostry, zapalny, neuropatyczny (Horvath G. 2000). EM wydają się być jednak słabszym analgetykiem niż morfina w znoszeniu bólu zapalnego, ale podobnie jak morfina wykazują silne działanie antynocycępcyjne w bólu neuropatycznym. Podobnie jak w przypadku innych peptydów czas trwania anaigezji wywołanej podaniem EM jest krótki i zanika w ciągu pół godziny (Mizoguchi H. i wsp. 1999). EM są małymi peptydami, złożonymi tylko z 4 aminokwasów dlatego są podatne na szybki rozkład przez peptydazy (Peter A. i wsp. 1999). Degradacja enzymatyczna EM nie tłumaczy w pełni przyczyny krótkiego czasu trwania anaigezji, ponieważ rozkład enzymatyczny EM w płynie mózgowo-rdzeniowym jest dość powolny i zajmuje ok. 2 godzin. W celu wyjaśnienia tego problemu przyjrano się więc wpływowi EM na rozwój ostrej tolerancji. Jak wiadomo pojedyncze iniekcje agonistów receptorów opioidowych prowadzą do krótkotrwałej desensytyzacji na tego samego agonistę zwanej

efektem ostrej tolerancji. Ostra tolerancja trwa tyle, ile trwa wiązanie agonisty do receptora (Narita M. i wsp. 1997). Ostra tolerancja na EM rozwija się gwałtownie w ciągu 30 min. i zanika po 3 godzinach. Szybki i gwałtowny rozwój ostrej tolerancji może tłumaczyć krótkotrwały efekt przeciwbólowy EM. Zarówno EM-1 jak i EM-2 wykazują po zastosowaniu wiele efektów ubocznych do których zalicza się zwiększenie aktywności lokomotorycznej, zahamowanie perystaltyk jelit, depresja krążeniowa i oddechowa (Czapla M.A. i wsp. 2000). EM jest peptydem opioidowym zdefiniowanym jako częściowy agonista, natomiast pozostałe endogenne peptydy opioidowe wykazują pełne działanie agonistyczne do odpowiednich receptorów opioidowych (Mizoguchi H. i wsp. 2001). Teoretycznie, wysokie dawki częściowego agonisty mogą częściowo znieść efekt pełnego agonisty, działającego poprzez ten sam receptor. Tak EM częściowo znosi efekt  $\beta$ -endorfiny. W specyficznych warunkach fizjologicznych, w których system opioidowy receptora  $\mu$  ulega nadmiernej stymulacji, EM mogą chronić zbyt dużą stymulację receptora  $\mu$  poprzez  $\beta$ -endorfiny na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Dochodzi do tego w tkankach, w których EM i  $\beta$ -endorfina są zlokalizowane (Sakurada S. i wsp. 2006). Krótkotrwały efekt analgetyczny endomorfiny-1 a także niska przepuszczalność bariery krew-mózg dla związków peptydowych sugerują rozwiązanie w postaci ciągłych iniekcji obwodowych lub centralnych, mających na celu wydłużenie czasu trwania działania EM. (Csullog E. i wsp. 2001)

## 6. Badanie progu bólowego

Test cofania ogona jest najbardziej rozpowszechnionym testem badania progu bólu. W teście tym, z receptorów bólu pobudzenie przewodzone jest do rogów grzbietowych rdzenia pierwotnymi, aferentnymi, bezmielinowymi włóknami C lub zmielinowanymi włóknami A deita. Pierwotne włókna aferentne tworzą synapsy z interneuronami substancji gajaretowatej oraz neuronami projekcyjnymi. Z interneuronów tych pobudzenie przekazywane jest z jednej strony na motoneurony rogów

przednich rdzenia kręgowego, a z drugiej do wyższych pięter układu nerwowego (wzgórze, kora). Test cofania ogona jest więc modelem, w którym wykorzystuje się występowanie prostego odruchu unikania bodźca nocycyptywnego. Jednakże odruch ten znajduje się pod silnym wpływem układów zstępujących z wyższych pięter układu nerwowego (Maszczyńska I., 1999).

Do eksperymentów użyto myszy, wcześniej poddanych procedurze selekcyjnej w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Dyrektora Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN oraz Lokalnej Komisji Etycznej (nr opinii 32/2005, nr wniosku 21/2005). Eksperymenty przeprowadzono na samcach. Badane związek podawano dootrzewnowo lub dożylnie do żyły ogonowej (Tabela 1,2). Każda mysz używana była tylko do jednej serii doświadczeń. Analgezję mierzono w teście cofania ogona (*hot water tail flick test*), w którym jako bodziec stosowano wodę o temperaturze 55<sup>o</sup>C. (Ryc.14, 15). Szczegółowy podział zwierząt na grupy przedstawia Tabela 1.



Ryc.14. Badanie progu bólowego w teście cofania ogona



Ryc.15. Badanie progu bólowego w teście cofania ogona

Woda podgrzewana była do wymaganej temperatury termostatem ST1 (prod. OSTA electronics) a jej temperatura była monitorowana i utrzymywana na stałym poziomie podczas trwania doświadczenia. Mysz chwymano za grzbietowy fałd skóry i zanurzano ogon w wodzie tak, aby w przypadku iniekcji dożyłnej, poziom wody znajdował się poniżej miejsca podania związku. W ten sposób eliminowano miejscowy efekt działania substancji. W celu uniknięcia uszkodzenia tkanek, maksymalny czas drażnienia ogona ustalono na 10 sekund. Próg czucia bodźca nocyceptywnego określano przed oraz w 5, 15, 30, 60 i 120 min. po podaniu związku. Stopień analgezji wyrażano jako procent maksymalnego możliwego efektu (% Maximal Possible Effect, % MPE) obliczany według wzoru Brady i Holtzman:

$$\% \text{ M P E } = \frac{T_{(5-120)} - T_0}{10 - T_0} \times 100$$

% M P E - (% M a x i m a l P o s s i b l e  
 % m a k s y m a l n e g o m o ż l i w e g o e f e k t u  
 T<sub>0</sub> - c z a s r e a k c j i p r z e d p o d a n i e m z w i ą z k u  
 T<sub>(5-120)</sub> - c z a s r e a k c j i p o p o d a n i u w o d p o w i e d n i m p r z e d z i a ł e c z a s o w y m  
 10 - s t a ł a c z a s o w a

Z uzyskanych wyników obliczano średnie wartości %MPE dla poszczególnych jednostek czasowych. Wartości liczbowe podano jako średnią w grupie uwzględniając odchylenie standardowe. Wyniki poddano analizie statystycznej korzystając z testu t- studenta, porównując dwie grupy względem siebie linię myszy HA do linii LA i do linii K. Różnice w wartościach uznano za istotne statystycznie dla wartości p<0,05 lub p<0,001. Do wykonania obliczeń statystycznych użyto programu komputerowego Microsoft Office 2000.

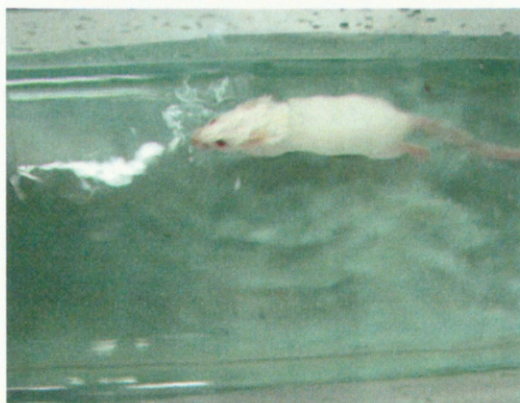
Tabela 1. Podział zwierząt na grupy

linia myszy	nazwa związku	droga podania	dawka	liczba zwierząt
HA	morfina	<i>i.p.</i>	4 mg/kg	5
LA				7
K				7
HA	AA2016	<i>i.v.</i>	4 mg/kg	7
LA				7
K				7
HA	bifalina	<i>i.v.</i>	2 mg/kg	6
LA				7
K				7

## 7. Stresowanie zwierząt

W przeprowadzonych doświadczeniach badano także wpływ stresu na efekt analgetyczny podawanych związków. W tym celu wystawiano zwierzęta na działanie czynników stresowych jakimi było wymuszone pływanie lub dootrzewnowe podanie roztworu formaliny. Próg bólowy badano przed i po zastosowaniu stresora.

W pierwszym przypadku zwierzęta były zmuszane do pływania (Ryc.16). Plastikowe naczynie wypełniane było wodą do takiego poziomu aby uniemożliwić pływającej myszy podpieranie się tylnymi kończynami o dno naczynia a także uniemożliwić wyskoczenie z pojemnika. Temperatura wody wynosiła 20<sup>0</sup>C i była monitorowana przez czas trwania eksperymentu. Zwierzęta pływały w wodzie przez 3 min.

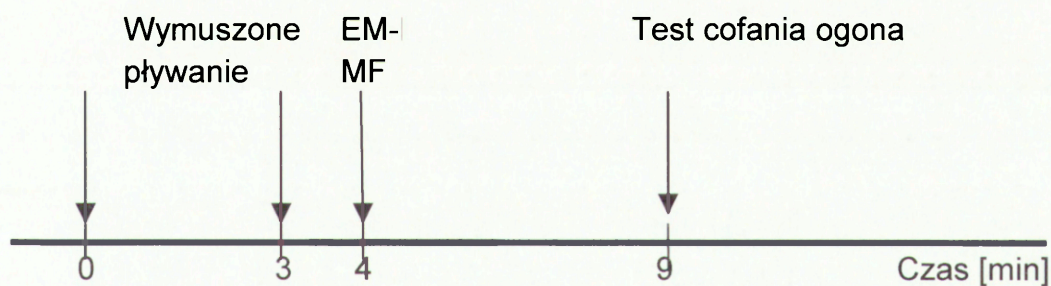


Ryc.16. Stres - wymuszone pływanie

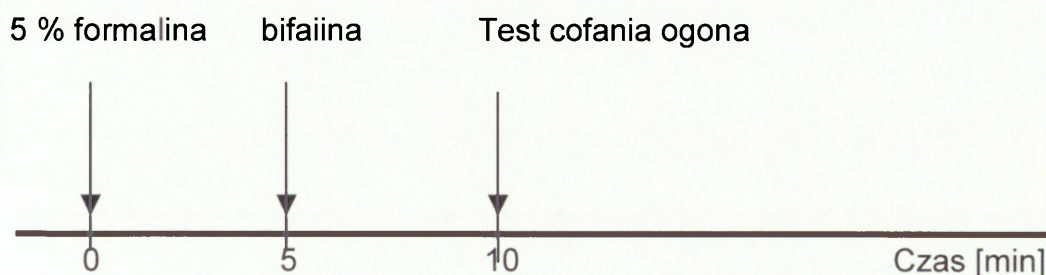
Następnie umieszczane były w klatce z ligniną i pozostawiano je tam na 1 min. w celu osuszenia sierści. Po upływie 1 min. związki podawano obwodowo tzn. dożylnie lub dootrzewnowo i badano efekt analgetyczny w teście cofania ogona (Ryc. 17).

Uszkodzenie tkanek oprócz tego, że wywołuje ból powoduje stres. Wykazano, że podanie formaliny prowadzi do wzrostu poziomu  $\beta$ -endorfin w osoczu krwi obwodowej (Aloisi A.M. i wsp. 1995). Formalina ma działanie

dwufazowe: w pierwszej fazie imituje ból ostry, natomiast w drugiej fazie mamy do czynienia z bólem związanym z rozwijającym się stanem zapalnym (Lutfy K. i wsp. 1996). Wykazano, że uwainiane podczas rozwoju stanu zapalnego, czynniki prozapalne wpływają na integrainość BBB, prowadząc do zwiększenia jej przepuszczalności (Huber J.D. i wsp. 2001). Zastosowanie takiego czynnika stresowego pozwoli ocenić wpływ stresu jak i rozwijającego się stanu zapalnego na przepuszczalność bariery krew-mózg u selekcyonowanych linii myszy. Dlatego drugim rodzajem stresora zastosowanym w pracy, było dootrzewnowe podanie 5% roztworu formaliny w objętości 25  $\mu$ i. Po upływie 5 min. od podania roztworu formaliny podawano dożylnie związki opioidowe i badano ich efekt anaigetyczny w poszczególnych przedziałach czasowych w teście cofania ogona (Ryc. 18). Szczegółowy podział zwierząt na grupy przedstawia Tabela 2.



Ryc. 17. Schemat badania aktywności przeciwbólowej związku po zastosowaniu czynnika stresowego w postaci wymuszonego pływania



Ryc. 18. Schemat badania aktywności przeciwbólowej związku po dootrzewnowym podaniu roztworu formaliny

Tabela 2. Podział zwierząt na grupy

linia myszy	czynnik stresowy	nazwa związku	droga podania	dawka	liczba zwierząt
HA	wymuszone pływanie 3 min. temp. 20°C	morfina	<i>i.p.</i>	4 mg/kg	7
LA					7
K					7
HA		EM-I	<i>i.v.</i>	4 mg/kg	7
LA					5
K					5
HA	5% formalina	bifaiina	<i>i.v.</i>	2 mg/kg	7
LA					5
K					7
HA	wymuszone pływanie 3 min. temp. 20	-	-	-	8
LA					8
K					5
HA	5% formalina	-	-	-	7
LA					7
K					6



## 8. Identyfikacja peptydu opioidowego AA2016 w mózгах selekcyonowanych myszy.

Identyfikacji peptydu opioidowego AA2016 w preparatach mózgu myszy HA, LA i K wykonano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej na fazach odwróconych RP-HPLC, z wykorzystaniem detektora fiuorescencyjnego (Schimadzu RF-551).

Ilość zwierząt z poszczególnych linii wynosiła n=5. Mysiom z poszczególnych linii podano do żyły ogonowej peptyd opioidowy AA2016 w dawce 0.5 mg/kg, w objętości 50  $\mu$ l. Następnie badano ich odruchy cofania ogona w poszczególnych przedziałach czasowych. W związku z tym, że w obrębie danej linii nie wszystkie myszy odpowiedziały podobnie na zastosowany peptyd, zwierzęta podzielono na dwie grupy: wykazujące wysoką i niską analgezję po zastosowaniu AA2016. Po zakończeniu badania, myszy poddawano eutanazji poprzez przedawkowanie halotanu. Po dekapitacji, izolowano mózgi w celu przeprowadzenia dalszej analizy. Mózgi pogrupowano według wcześniej określonych kryteriów jakimi były wysokie i niskie wartości %MPE. Do dalszej anaiizy wybrano po 2 mózgi myszy wykazujących wysoką i niską anaigezję po zastosowaniu AA2016. Mózgi homogenizowano w aikoioiu metylowym. Tak przygotowane próbki anaiizowano w gradiencie 0-100% MeOH w 20 min., gdzie fazą ruchomą był H<sub>2</sub>O (0,05% TFA) oraz MeOH, przy przepływie solwentu 1ml/min. Emisję mierzono przy długości fali 455nm.

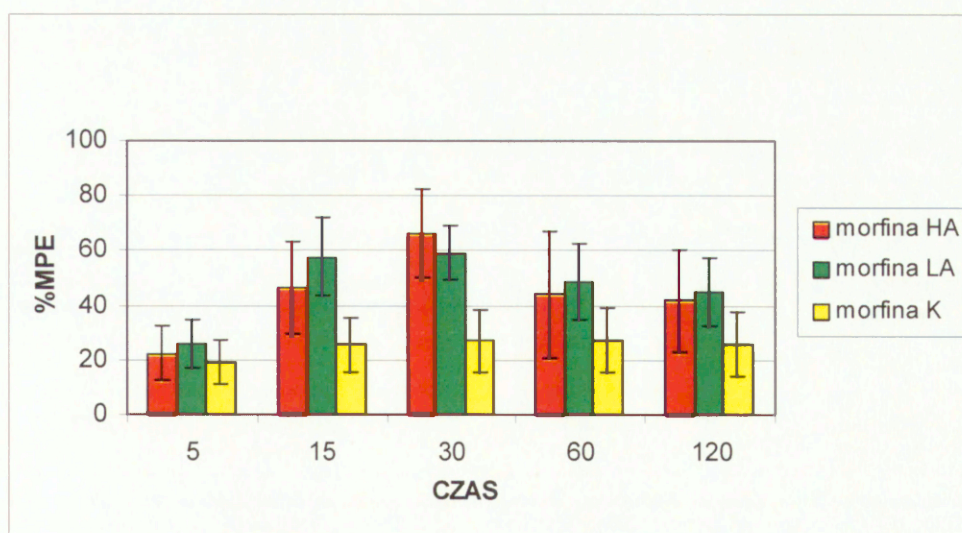
## **9. Mikroskopia elektronowa.**

Do badań użyto wyselekcjonowanych myszy w wieku 3-4 mc., które nie były wcześniej poddawane żadnym procedurom doświadczalnym tzn. nie testowano na nich żadnych substancji ani nie poddawano ich działaniu czynników stresowych. Zwierzęta znieczulano przy użyciu narkozy wziewnej (halotan), następnie dekapitowano i pobierano mózgi. Z mózgu pobierano wycinek z kory warstwy czołowej. Pobrane wycinki utrwalano przez 1godz. w 2,5% aldehydzie glutarowym rozpuszczonym w 0,1M buforze kakodylowym o pH 7,4. Wtórnego utrwalaenia dokonano w 1% OsO<sub>4</sub> (czterotlenek osmu) w 0,1 M PBS przez 30 min. Następnie materiał był zatapiany w żywicy epoksydowej Epon 812 i barwiony octanem uranyiu i cytrynianem ołowiu. Bloczki tkanek cięto na mikrotomie Reichert 2 a następnie badano w mikroskopie elektronowym JOEL 1200 EX.

## 10. Wyniki

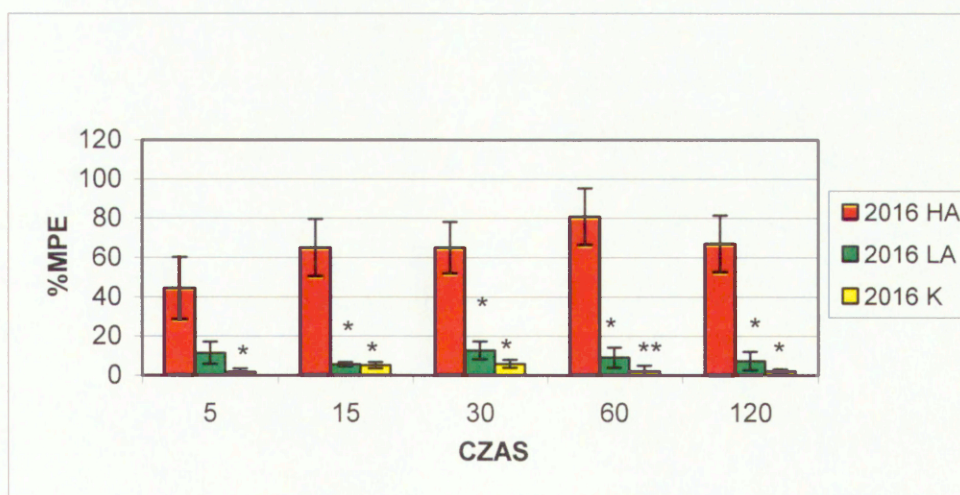
### 10.1. Porównanie analgezji morfinowej do analgezji wywołanej przez peptyd opioidowy AA2016 u selekcyonowanych linii myszy

Celem doświadczenia było wykazanie różnic w poziomie analgezji wywołanej obwodowym podaniem MF i peptydu opioidowego AA2016 pomiędzy liniami myszy HA, LA i K. MF podawano dootrzewnowo (i.p) w dawce 4 mg/kg w objętości 100  $\mu$ l i badano jej efekt anaigetyczny w teście cofania ogona. Efekt analgetyczny uzyskany dootrzewnowym podaniem MF nie różnił się pomiędzy selekcyonowanymi liniami zwierząt i osiągał wartości maksymalne t.j. 66,1 i 58,9% MPE w 30 min. po podaniu odpowiednio u linii HA i LA. Po upływie 1 godziny od podania MF analgeza była wciąż obserwowana, jednak jej poziom nieznacznie spadał tak aby w ostatnim z badanych przedziałów czasowych osiągnąć wartości 41,6% MPE u linii HA i 44,6% MPE u linii LA. Poziom analgezji morfinowej u nieselekcyonowanej linii K wydaje się być niższy niż u linii HA i LA, jednak nie są to różnice istotne statystycznie (Ryc.19).



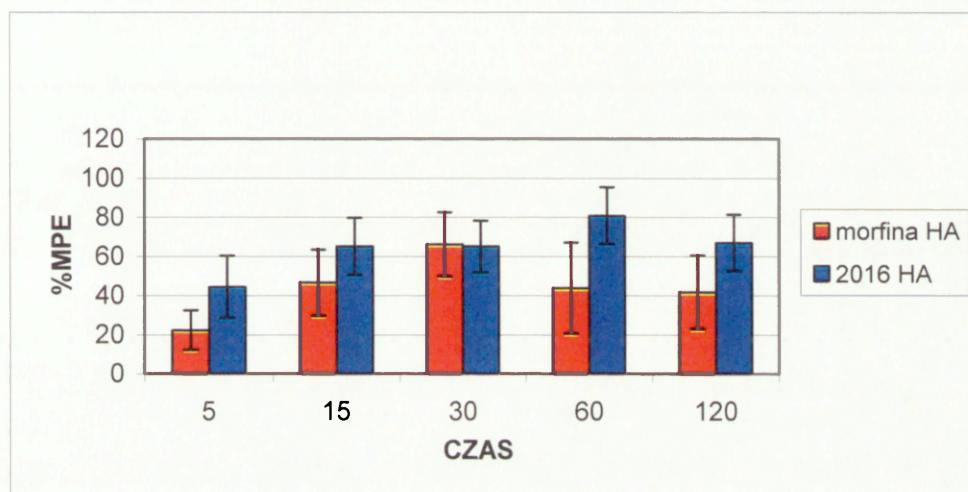
Ryc. 19. Efekt analgetyczny MF w dawce 4 mg/kg i.p. u selekcyonowanych linii myszy HA, LA i linii kontrolnej K

Kolejny etap doświadczenia miał na celu wykazanie różnic w poziomie analgezji wywołanej peptydem opioidowym AA2016. Związek podawano dożylnie w dawce 4 mg/kg w objętości 50  $\mu$ l i badano efekt analgetyczny w teście cofania ogona. Uzyskane wyniki wykazały, że AA2016 najsilniej działa u linii HA, natomiast u linii LA i K efekt jest bardzo niewielki lub nie ma go wcale. U linii HA związek AA2016 już w 5 min. po podaniu wykazywał analgezję na poziomie 44,3% MPE, następnie w miarę upływu czasu poziom analgezji wzrastał do wartości 64,9 i 65% MPE w 15 i 30 min. od podania, by osiągnąć wartości maksymalne 80,7% MPE w 60 min. od podania. W ostatnim badanym przedziale czasowym poziom analgezji wywołanej podaniem obwodowym AA2016, lekko spadł i tak wartości te plasowały się na poziomie 66,9% MPE. W przeciwieństwie do linii HA, u linii LA i K obserwowane efekty analgetyczne AA2016 były niewielkie. U linii LA maksymalny efekt przypadał w 30 min. od podania badanego związku i wynosił 12% MPE. W przypadku linii K najwyższy zarejestrowany poziom analgezji zaobserwowano także w 30 min. od podania i tak wartości te były niewielkie i wynosiły tylko 5,8% MPE. (Ryc.20).



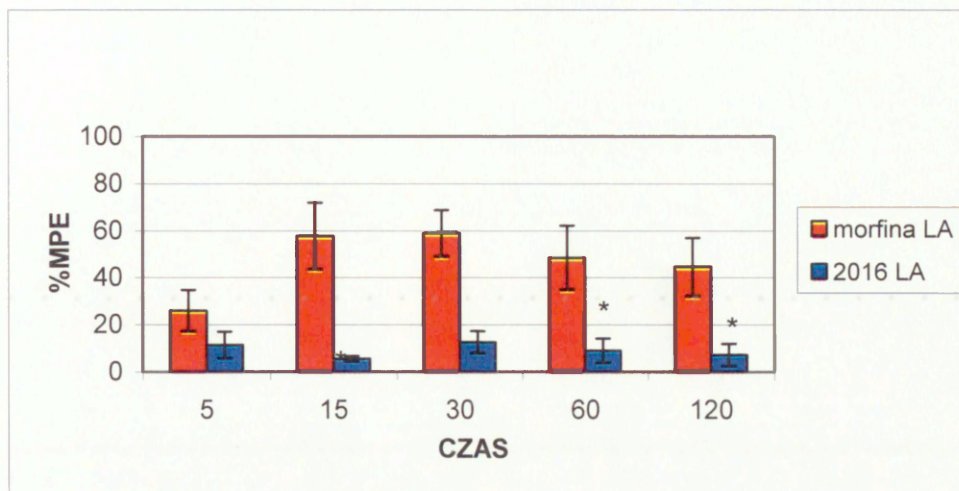
Ryc.20. Efekt analgetyczny AA2016 w dawce 4 mg/kg i.v. u selekcyonowanych linii myszy HA, LA i linii kontrolnej K \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$

W kolejnej części doświadczenia postanowiono porównać poziom analgezji MF i AA2016 w obrębie danej linii myszy. Porównanie wykazało brak istotnych różnic w poziomie analgezji wywołanej podaniem MF a AA2016 u linii HA. Zarówno MF jak i peptyd opioidowy AA2016 wykazywały podobny efekt antynocycepcyjny, zwłaszcza w 30 min. od podania (Ryc.21).



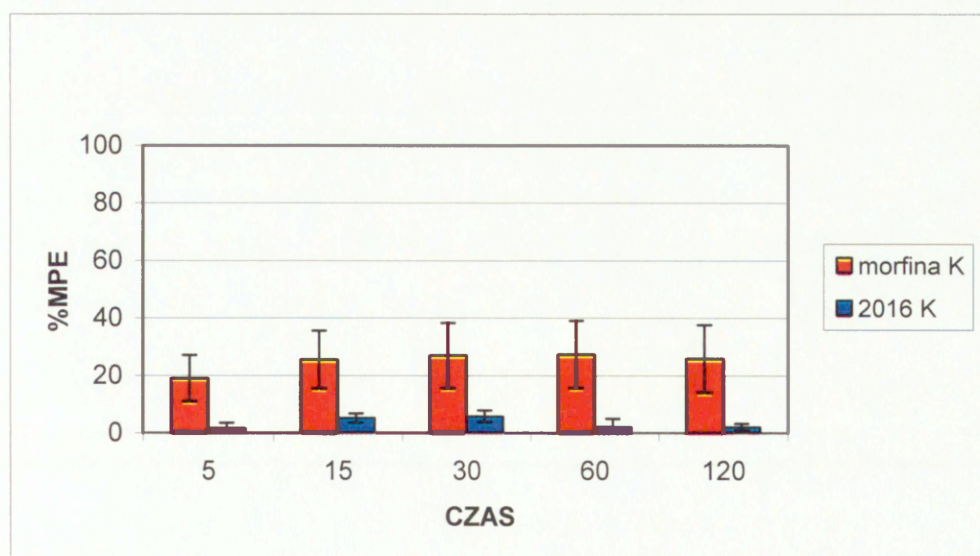
Ryc.21. Porównanie analgezji MF w dawce 4 mg/kg i.p. i AA2016 w dawce 4 mg/kg i.v. u linii HA

Porównanie efektów analgetycznych w obrębie linii LA wykazało istotne różnice w poziomie analgezji wywołanej podaniem MF i AA2016 u tych zwierząt. MF w porównaniu z peptydem AA2016 wykazywała znacznie wyższy efekt antynocycepcyjny niż peptyd. W 30 min. od podania MF wywołała analgezę na poziomie 60% MPE i były to wartości maksymalne. Peptyd AA2016 najwyższą zaobserwowaną analgezę wywołał także w 30 min. po podaniu iecz wartości te wynosiły tylko 13% MPE (Ryc. 22).



Ryc.22. Porównanie analgezji MF w dawce 4 mg/kg i.p. i AA2016 w dawce 4 mg/kg i.v. u linii LA \* $p < 0,05$

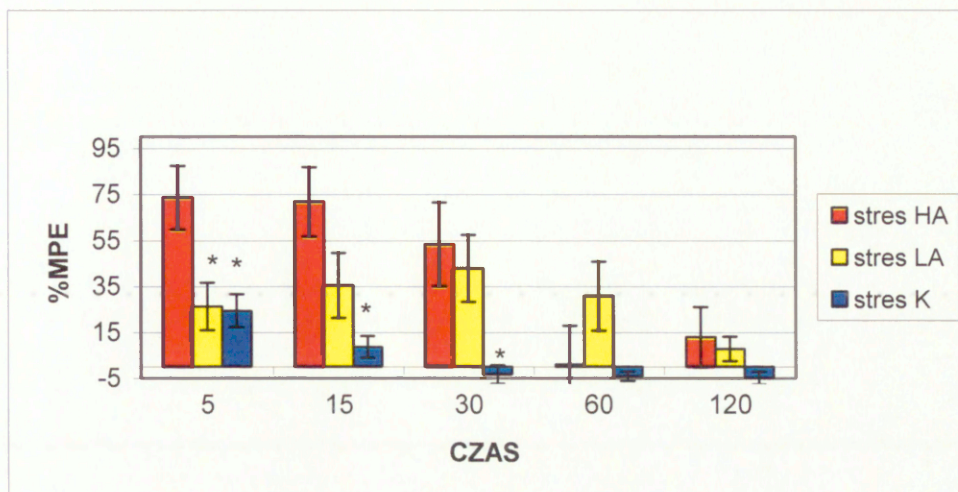
Porównanie efektów analgetycznych w obrębie linii nieselekcjonowanej K nie wykazało istotnych różnic w poziomie analgezji wywołanej podaniem MF a AA2016 u tych zwierząt. W 30 min. od podania MF wywołała analgezę na poziomie 27% MPE. Efekt ten utrzymywał się na podobnym poziomie do końca badania. Peptyd AA2016 najwyższą zaobserwowaną analgezę wywołał także w 30 min. po podaniu lecz wartości te były bardzo niewielkie (Ryc.23).



Ryc.23. Porównanie analgezji MF w dawce 4 mg/kg i.p. i AA2016 w dawce 4 mg/kg i.v. u linii K

## 10.2. Wpływ stresu na efekt analgetyczny MF u selekcyjowanych linii myszy.

Zadziałanie bodźcem stresowym na zwierzę wywołuje u niego stres a tym samym może zmniejszać odczucie bólu powodując analgezę wywołaną stresem. Dlatego też, w kolejnym etapie badań postanowiono sprawdzić w jakim stopniu stres przyczynia się do hamowania odruchów cofania ogona i jaki ma wpływ na poziom analgezji wywołanej podaniem MF. Próbowano ocenić czy stres wpływa na zwiększenie analgezji morfinowej u selekcyjowanych linii myszy. Jako czynnik stresowy zastosowano wymuszone pływanie w zimnej wodzie a następnie badano poziom analgezji w teście cofania ogona. Otrzymane wyniki wykazały, że zastosowanie stresora w postaci wymuszonego pływania wywołuje analgezę zarówno u linii HA jak i u LA, jednakże analgezja u linii HA była znacznie silniejsza. U linii HA już w 5 min. po zakończeniu pływania obserwowano analgezę na poziomie ponad 70% MPE a tak wysoki efekt utrzymywał się do 15 min. od zastosowania stresora. Po upływie 30 min. od zakończenia pływania poziom analgezji obniżał się nieznacznie i całkowicie zanikał po 1 godz. Poziom analgezji wywołanej stresem u linii LA był niższy niż u linii HA i narastał powoli tak aby w 30 min. od zastosowania stresora osiągnąć efekt maksymalny tzn. ok. 30% MPE. Następnie efekt malał. W przypadku linii K zadziałanie stresora nie wywołało analgezji o wysokim poziomie i od 15 min. po zakończeniu pływania u zwierząt nieselekcyjowanych obserwowano niewielką hiperalgezę. Na uwagę zasługuje fakt, że wymuszone pływanie wywoływało analgezę na wysokim poziomie u linii HA, jednakże była ona krótkotrwała i zanikała po 30 min. Natomiast u linii LA stresor wywołał analgezę na niższym poziomie lecz trwała ona znacznie dłużej (Ryc.24).



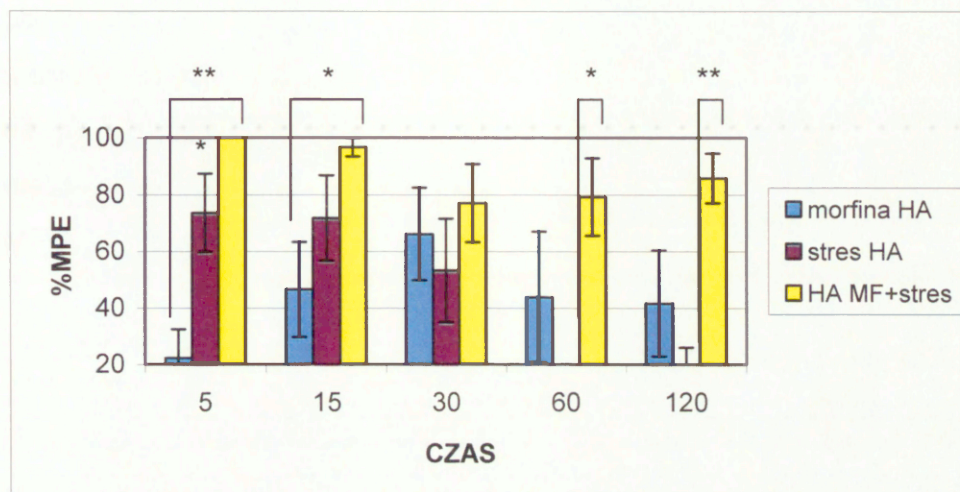
Ryc.24. *Efekt analgetyczny po zastosowaniu stresora w postaci wymuszonego pływania u myszy linii HA, LA, K \* $p < 0,05$*

Poprzedni eksperyment wykazał, że myszy linii HA są bardziej wrażliwe na działanie czynnika stresowego a tym samym wykazują znacznie wyższy poziom analgezji niż zwierzęta selekcjonowane w kierunku niskiej analgezji postresowej i myszy linii kontrolnej. W związku z tym postanowiono sprawdzić czy i w jakim stopniu stres wywołany wymuszonym pływaniami wpływa na aktywność MF u selekcjonowanych linii myszy. W tym celu przeprowadzono kolejne badanie, w którym najpierw zwierzęta stresowano (wymuszone pływanie), a 5 min. później podawano MF dootrzewnowo (i.p) w dawce 4 mg/kg w objętości 100  $\mu$ l i badano jej aktywność w poszczególnych przedziałach czasowych w teście cofania ogona.

Otrzymane wyniki wykazały, że efekt analgetyczny MF u stresowanych myszy linii HA był znacznie wyższy niż efekt MF u zwierząt niestresowanych tejże linii i już w 5 min. od podania związku poziom analgezji wynosił 100% MPE. Następnie w 30 min. badania efekt maleł do 77% MPE, jednakże w ostatnim badanym przedziale czasowym poziom analgezji wzrastał do 85% MPE. Porównanie efektu MF u zwierząt stresowanych i niestresowanych wykazuje, że zastosowanie stresora znacznie zwiększa poziom analgezji MF. Dane wykazują jednak, że sam stresor wywołuje analgezję wyższą od analgezji MF. Analgezja ta jest jednak krótka i zanika po 60 min. od zastosowania czynnika stresowego, natomiast

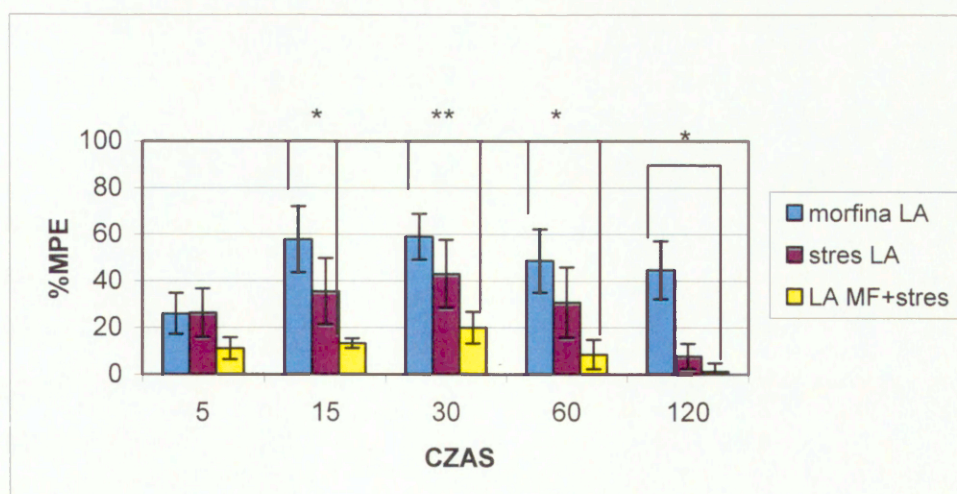


w tym samym przedziale czasowym u zwierząt wystawionych na działanie czynnika stresowego którym podano MF można obserwować analgezję na poziomie 80% MPE. Efekt ten utrzymuje się do końca badania. (Ryc.25).



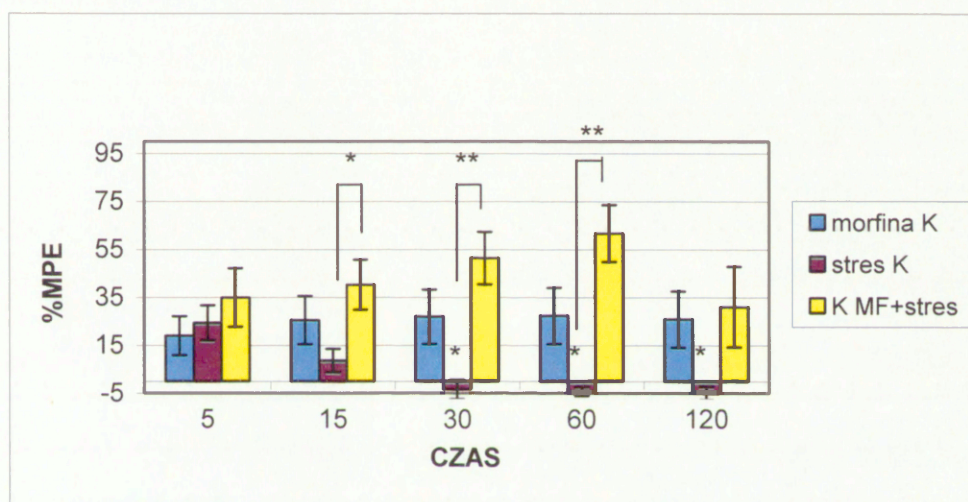
Ryc.25. Wpływ stresu na efekt analgetyczny MF w dawce 4 mg/kg i.p. u myszy linii HA \* $p < 0,05$ ,  $p^{**} < 0.001$

Badanie przeprowadzone z użyciem myszy linii LA wykazały całkiem odmienne wyniki w porównaniu do linii HA. Zwierzęta te są mniej wrażliwe na stres i analgezja wywołana stresem jest na poziomie o połowę niższym niż u linii HA, jednakże w 30 min. od zastosowania czynnika stresowego jej poziom wynosi 42,9% MPE. MF u stresowanych myszy inii LA najwyższy efekt wykazuje w 30 min. na poziomie tylko 19,89% MPE. (Ryc.26).



Ryc.26. Wpływ stresu na efekt analgetyczny MF w dawce 4 mg/kg i.p. u myszy linii LA \* $p < 0,05$ ,  $p^{**} < 0.001$

Nieselekcjonowana linia myszy K jest słabo wrażliwa na działanie czynnika stresowego i analgezyja wywołana stresem nie dość, że jest na niskim poziomie w porównaniu do linii HA i LA jest także krótkotrwała i zanika po 30 min. od zakończenia pływania. Pomimo braku efektu stresu w 30 min. u stresowanych myszy K, MF wykazuje znacznie wyższy efekt analgetyczny, na poziomie 51% MPE w 30 min i 61% MPE w 60 min niż MF u zwierząt niestresowanych, gdzie efekt MF wynosił w 30 i 60 min odpowiednio 26,9% MPE i 27,3% MPE. (Ryc.27).

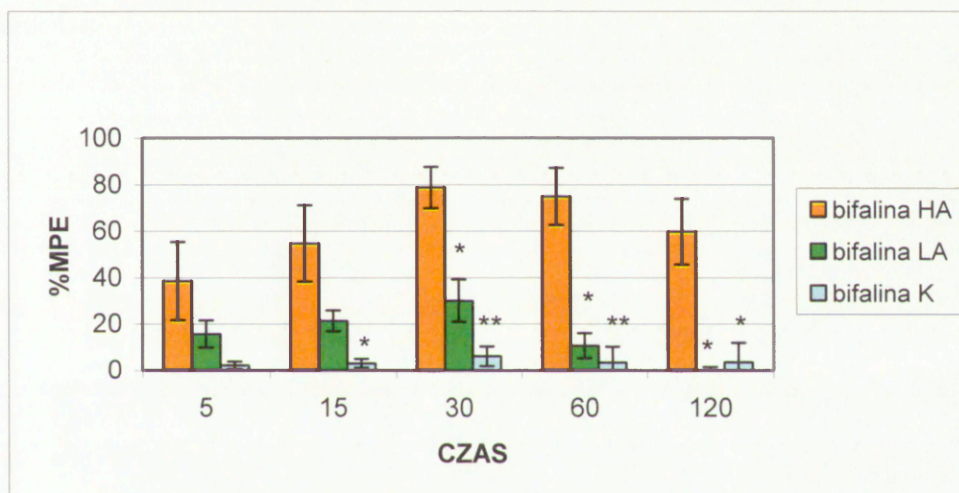


Ryc.27. Wpływ stresu na efekt analgetyczny MF w dawce 4 mg/kg i.p. u myszy linii K \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$

### 10.3. Porównanie efektu analgetycznego bifaliny oraz wpływ stresu na poziom analgezji u selekcjonowanych linii myszy

W poprzednich eksperymentach wykazano, że myszy linii HA, LA i K wykazują taki sam poziom analgezji po podaniu alkaloidu MF natomiast zaobserwowano różnice jeżeli chodzi o aktywność związków peptydowych. Wyniki te sugerują istnienie zmian w przepuszczalności BBB dla peptydów opioidowych zwłaszcza u linii HA. Dlatego w kolejnym badaniu postanowiono zbadać czy między selekcjonowanymi liniami myszy istnieją różnice w poziomie analgezji po zastosowaniu bifaliny, która jest związkiem częściowo przechodzącym przez BBB. Bifalina podawana była dożylnie w dawce 2 mg/kg w objętości 50ul. a następnie badano jej aktywność w poszczególnych

przedziałach czasowych. Bifalina najsilniej zadziałała u myszy inii HA wywołując już w 5 min. po podaniu analgezję na poziomie prawie 40% MPE. Efekt ten następnie narastał aby w 30 min. po podaniu osiągnąć poziom prawie 80% MPE. Następnie poziom analgezji zmniejszał się, aby w ostatnim badanym przedziale czasowym wynosić 60% MPE. Efekt analgetyczny bifaliny u linii LA był znacznie mniejszy niż u linii HA i najwyższą analgezję obserwowano w 30 min. po podaniu na poziomie 29,9% MPE. Następnie efekt malał. Najslabiej bifalina zadziałała u linii nieselekcjonowanej. (Ryc.28).

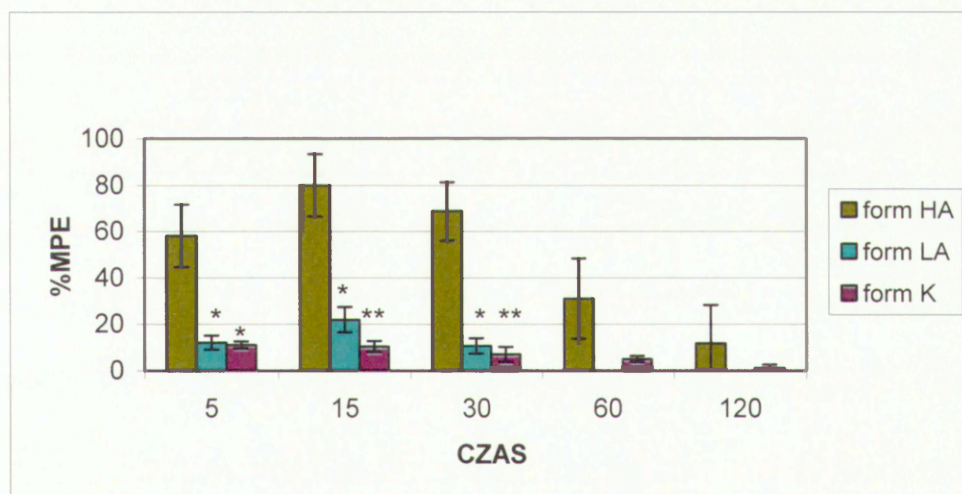


Ryc.28. Efekt analgetyczny bifaliny w dawce 2 mg/kg i.v. u selekcjonowanych linii myszy HA, LA i linii kontrolnej K \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$

We wcześniejszych badaniach wykazano, że stres w postaci wymuszonego pływania zwiększa analgezję wywołaną podaniem MF ale tylko u linii HA i K. Dlatego postanowiono zastosować inny stresor i sprawdzić czy i w jakim stopniu wpływa on na zwiększenie efektu analgetycznego bifaliny. Jako stresor zastosowano dootrzewnowe podanie roztworu formaliny a po upływie 5 min. dokonywano dożylniej iniekcji bifaliny i badano jej efekt analgetyczny w poszczególnych przedziałach czasowych. Postanowiono sprawdzić jaki efekt wywoła sam stres wynikający z podania formaliny. W tym celu zwierzętom wstrzykiwano dootrzewnowo 5% roztwór

formaliny a po upływie 5 min. badano odruchy bólowe w teście cofania ogona.

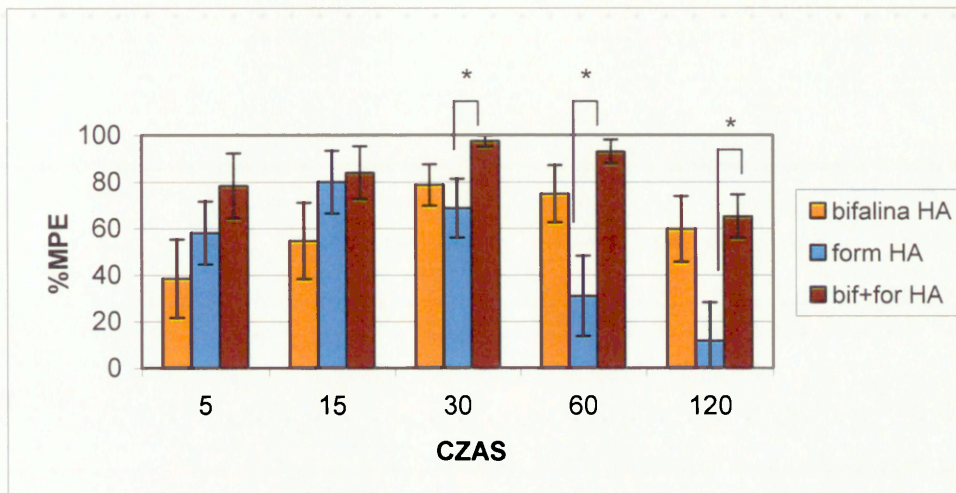
Podobnie jak wcześniej, najbardziej wrażliwe na zadziaływanie stresora okazały się myszy linii HA, które już w pierwszym przedziale czasowym wykazywały analgezję na poziomie prawie 60% MPE. Następnie efekt narastał do 80% MPE po czym pomału spadał, jednak był widoczny jeszcze po 120 min. od zastosowania stresora. Linia HA i linia K okazały się prawie wcale niewrażliwe na działywanie stresora w takiej postaci i wykazywały analgezję na niewielkim poziomie, a po 60 min. od zastosowania stresora u linii LA obserwowano hiperalgezję (Ryc.29).



Ryc.29. Efekt analgetyczny po zastosowaniu czynnika stresowego w postaci dootrzewnowego podania 5% roztworu formaliny u myszy linii HA, LA, K  
\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$

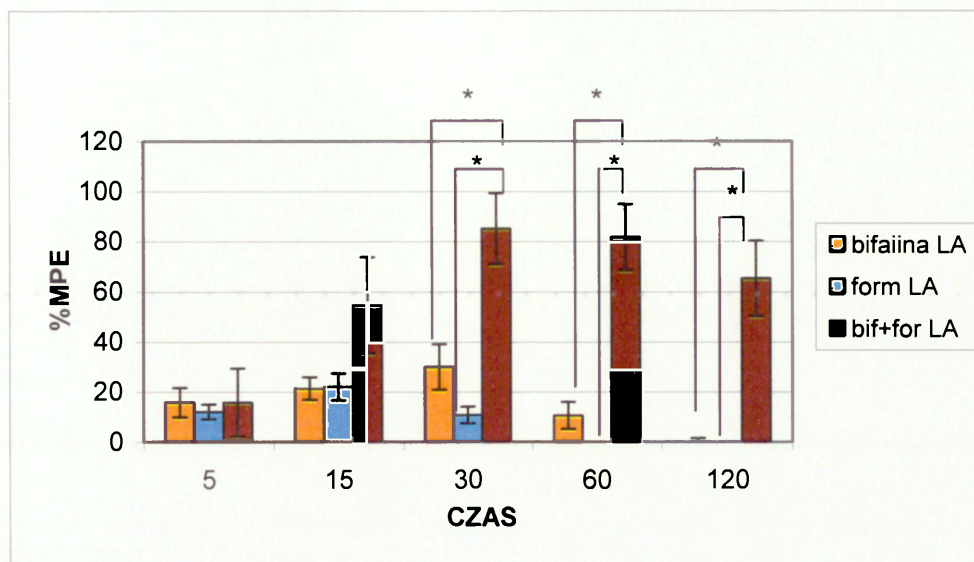
Bifalina jak i czynnik stresowy wywoływał u myszy linii HA wysoką, porównywalną analgezję, jednakże analgezja wywołana stresem była krótsza i 60 min. po zastosowaniu stresora jej poziom się obniżał. Postanowiono przyjrzeć się w jakim stopniu stres wpłynie na działywanie analgetyczne peptydu. Okazało się, że stres nasilał działywanie bifaliny u linii HA i w 30 min. badania analgezja ta wynosiła prawie 100% MPE, a efekt ten utrzymywał się

jeszcze w 60 min. badania. Nie zaobserwowano efektu stresu w 120 min. badania, natomiast efekt bifaliny u zestresowanych zwierząt był nieznacznie wyższy niż u zwierząt niestresowanych (Ryc.30).



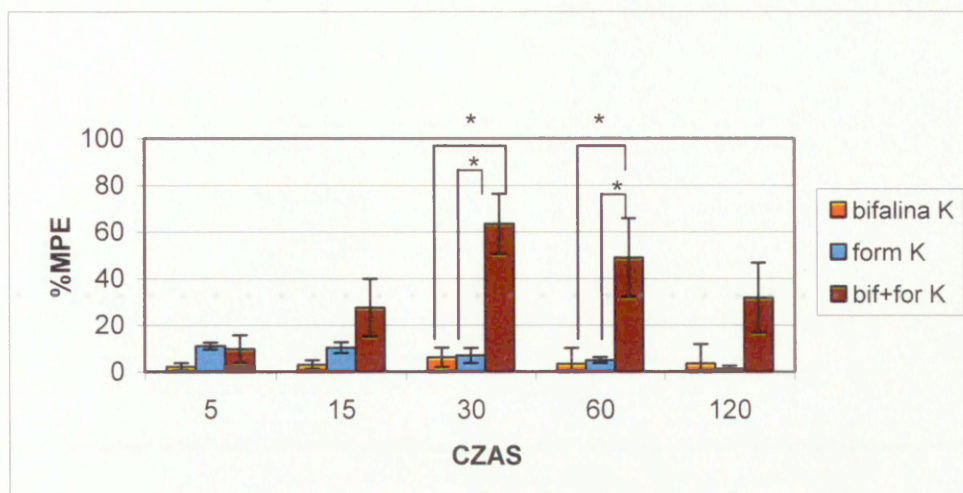
Ryc.30. Wpływ stresu na efekt analgetyczny bifaliny w dawce 2 mg/kg i.v u myszy linii HA \* $p < 0,05$

Bifalina jak i czynnik stresowy wywoływał u linii LA niewielką analgezę. Jednakże bifalina podana zwierzętom poddanym działaniu czynnika stresowego wykazuje wysoki poziom analgezji. Efekt ten zaczyna co prawda narastać w 15 min. badania i jest znacznie niższy niż u linii HA, jednakże w 30 min. badania osiąga poziom powyżej 80% MPE i utrzymuje się na podobnym poziomie jeszcze godzinę od podania związku. Pod koniec badania obserwować można jeszcze efekt analgetyczny na poziomie ponad 60% MPE. Samo podanie formaliny wywołuje analgezę na bardzo niskim poziomie u myszy linii LA a jednak efekt bifaliny u zwierząt stresowanych jest znacznie silniejszy niż u zwierząt niestresowanych. (Ryc.31).



Ryc.31. Wpływ stresu na efekt analgetyczny bifaliny w dawce 2 mg/kg i.v. u myszy linii HA \* $p < 0,05$

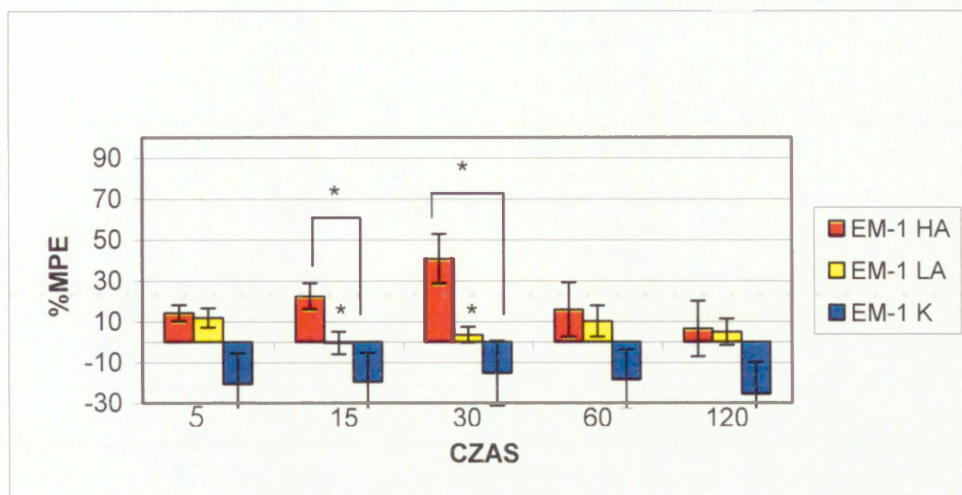
Bifaiina jak i czynnik stresowy wywoływał u linii K niewielką analgezję. Jednakże bifalina podana zwierzętom poddanym działaniu czynnika stresowego wykazuje wysoki poziom analgezji. Efekt ten zaczyna co prawda narastać w 15 min. badania i jest znacznie niższy niż u linii HA i LA, jednakże w 30 min. badania osiąga poziom ponad 60% MPE. Pod koniec badania obserwować można jeszcze efekt analgetyczny na poziomie ponad 30% MPE. Samo podanie formaliny nie wywołuje analgezji u myszy linii K a jednak efekt bifaliny u zwierząt stresowanych jest znacznie silniejszy niż u zwierząt niestresowanych. (Ryc.32).



Ryc.32. Wpływ stresu na efekt analgetyczny bifaliny w dawce 2 mg/kg i.v. u myszy linii K \* $p < 0,05$

#### 10.4. Porównanie efektu analgetycznego EM-1 oraz wpływ stresu na poziom analgezji u selekcyonowanych linii myszy

W kolejnym doświadczeniu badano poziom analgezji po zastosowaniu peptydu nieprzechodzącego przez BBB jakim jest EM-1. Zwierzętom linii HA, LA i K podano EM-1 dożylnie w dawce 4 mg/kg w objętości 50 $\mu$ l a następnie badano efekt analgetyczny w poszczególnych przedziałach czasowych. EM-1 podawana obwodowo, u myszy linii HA wywołała analgezję na poziomie 40% MPE w 30 min. po podaniu. U linii LA, w porównaniu do linii HA, efekt był niższy. O ile w 5 min. badania wartości te były podobne u obu linii zwierząt, to u linii LA w 15 min. po podaniu efekt EM-1 zanika a następnie plasuje się na poziomie znacznie niższym niż u linii HA. U linii K sytuacja po podaniu EM-1 wyglądała całkiem inaczej i podanie badanego związku nie wywołało żadnego efektu. U linii K zaobserwowano, że podanie obwodowe EM-1 wywołało hiperanalgezję (Ryc.33).



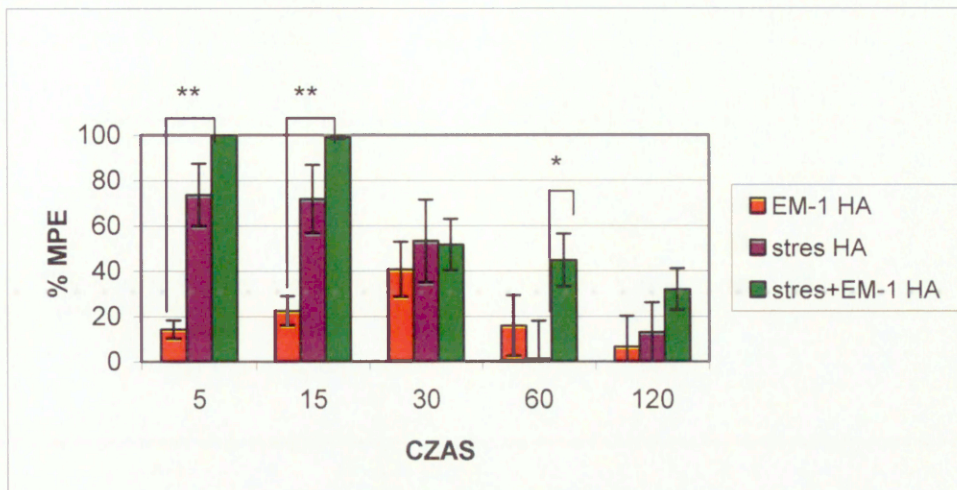
Ryc.33. Efekt analgetyczny endomorfiny-1 w dawce 4 mg/kg i.v u selekcyonowanych linii myszy HA, LA i linii kontrolnej K \* $p < 0,05$

W kolejnej części doświadczenia postanowiono sprawdzić czy stres w postaci wymuszonego pływania wpłynie na zwiększenie efektu analgetycznego EM-1.

W tym celu przeprowadzono kolejne badanie, w którym najpierw zwierzęta stresowano (wymuszone pływanie), a 5 min. później podawano EM-1 dożylnie (i.v) w dawce 4 mg/kg w objętości 50 ul i badano jej aktywność w poszczególnych przedziałach czasowych w teście cofania ogona.

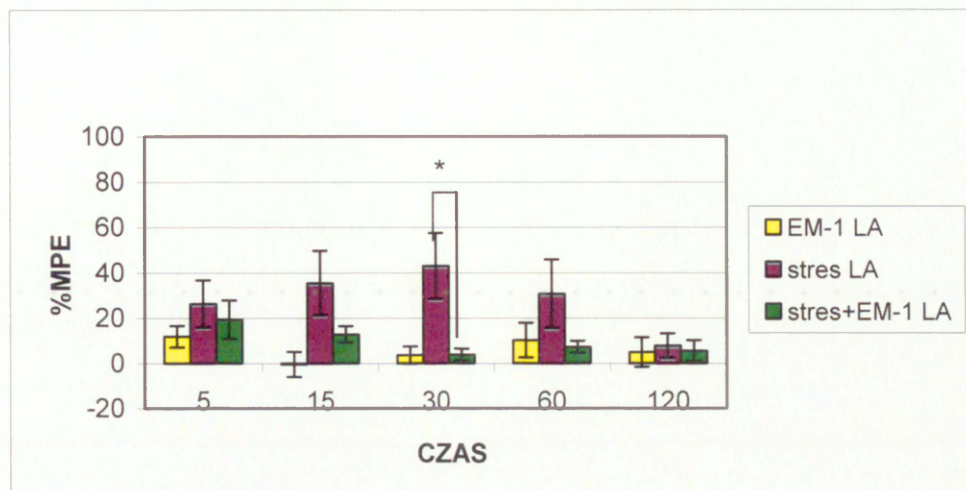
Otrzymane wyniki wykazały, że efekt analgetyczny EM-1 u stresowanych myszy linii HA był znacznie wyższy niż efekt EM-1 u zwierząt niestresowanych tejże linii i już w 5 min. od podania związku poziom analgezji wynosił 100% MPE. Efekt ten utrzymywał się do 15 min. badania. Następnie w 30 min. badania efekt malał jednakże utrzymywał się na poziomie podobnym jaki w tym przedziale wywołuje działanie samego stresora. Interesująca wydaje się być obserwacja, że w 60 min. badania nie obserwowano już analgezji wywołanej samym pływaniem, jednakże EM-1 u zwierząt stresowanych wywołała analgezję na znacznie wyższym poziomie niż sama EM-1 (Ryc.34).





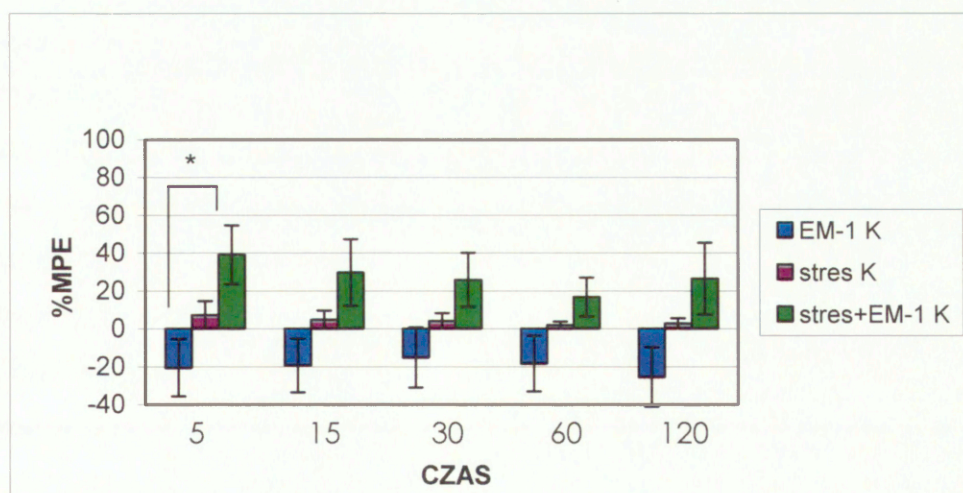
Ryc.34. Wpływ stresu na efekt analgetyczny EM-1 w dawce 4 mg/kg i.v. u myszy linii HA \* $p < 0,05$ ,  $p^{**} < 0.001$

Badanie przeprowadzone z użyciem myszy linii LA wykazały całkiem odmienne wyniki w porównaniu do linii HA. Zwierzęta te są mniej wrażliwe na stres i analgezja wywołana stresem jest na poziomie o połowę niższym niż u linii HA, jednakże w 30 min od zastosowania stresora jej poziom wynosi 42,9% MPE. Jeżeli u linii HA stres przyczynia się do zwiększenia aktywności EM-1 po podaniu obwodowym wydawało się prawdopodobne, że i u linii LA będzie miał podobny wpływ. Okazało się jednak, że podanie EM-1 zestresowanym zwierzętom linii LA nie przynosi spodziewanego efektu. Efekt ten jest nieznacznie podwyższony w stosunku do efektu wywołanego samą EM-1 w 5 min. badania, jednak niższy niż analgezja wywołana stresem. EM-1 u stresowanych myszy linii LA najwyższy efekt wykazuje w 5 min. badania na niewielkim poziomie a następnie jej poziom spada i utrzymuje się na poziomie niższym niż działanie samego stresu (Ryc.35).



Ryc.35. Wpływ stresu na efekt analgetyczny EM-1 w dawce 4 mg/kg i.v. u myszy linii LA \* $p < 0,05$

Nieselekcjonowana linia myszy K jest słabo wrażliwa na działanie stresora i analgezia wywołana stresem nie dość, że jest na bardzo niskim poziomie w porównaniu do linii HA i LA, jest także krótkotrwała i jej poziom obniża się po 30 min. od zakończenia pływania. Pomimo bardzo niewielkiego efektu stresu w 5 min. u stresowanych myszy K, EM-1 wykazuje znacznie wyższy efekt analgetyczny na poziomie 40% MPE. Efekt EM-1 u zwierząt stresowanych jest wyższy niż działanie stresu czy samej EM-1 i utrzymuje się na podobnym poziomie przez cały czas trwania doświadczenia (Ryc.36).



Ryc.36. Wpływ stresu na efekt analgetyczny EM-1 w dawce 4 mg/kg i.v. u myszy linii K \* $p < 0,05$

## 11. Wyniki- badania *in vitro*

O tym czy lek zadziała w dużej mierze decyduje jego zdolność do przechodzenia przez barierę krew- mózg. Dlatego też w kolejnym doświadczeniu postanowiono porównać ilość peptydu AA2016 w mózгах selekcyonowanych linii myszy za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

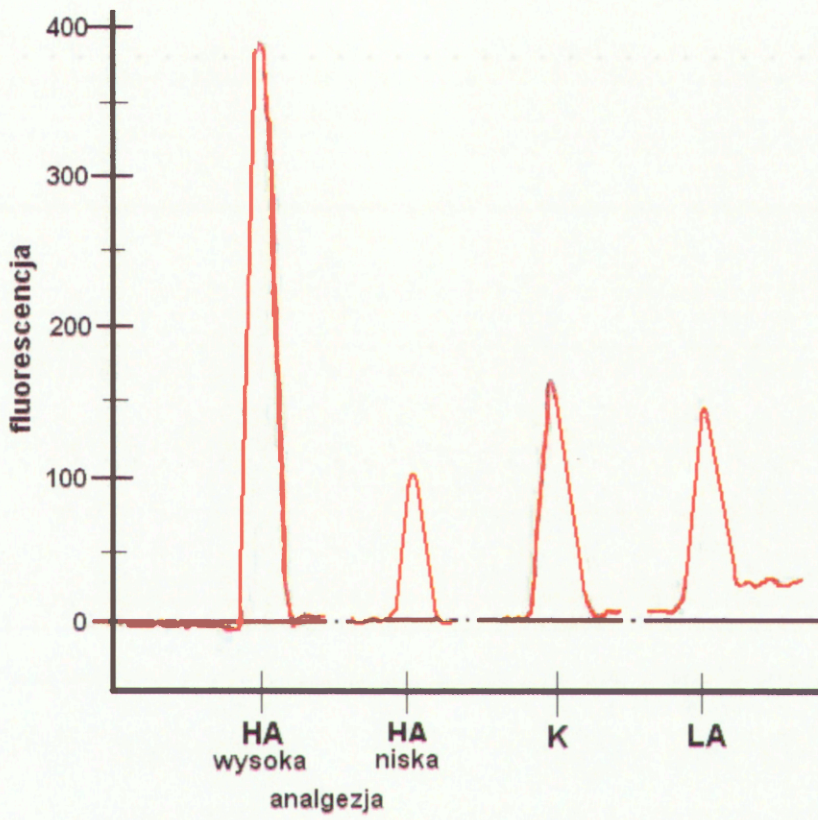
Zwierzętom podano dożylnie peptyd opioidowy AA2016 w dawce 0.5 mg/kg w objętości 50  $\mu$ l a następnie badano odruchy cofania ogona w poszczególnych przedziałach czasowych. W związku z tym, że zastosowana dawka była dosyć mała nie wszystkie zwierzęta w obrębie danej linii odpowiedziały podobnie. Zwierzęta w obrębie poszczególnych linii podzielono więc na dwie grupy: zwierzęta wykazujące niską i wysoką analgezję po podaniu AA2016 a kryterium podziału były najwyższe i najniższe wartości MPE. Dane te przedstawia tabela 1. Okazało się, że w przypadku linii HA otrzymane wartości MPE wahały się od 76% MPE w 60 min do nawet -7% MPE w 120 min. po podaniu. Grupa zwierząt linii HA reagująca na AA2016 wykazywała analgezję już w 5 min. po podaniu badanego związku na poziomie 53% MPE. Efekt ten narastał stopniowo do wartości 76% MPE w 60 min. badania a w ostatnim przedziale czasowym plasował się na poziomie 66,8% MPE. Zwierzęta z tej samej linii u których związek AA2016 wywołał słaby efekt przeciwbólowy wykazywały analgezję na znacznie niższym poziomie i dopiero w 60 min. od podania można zaobserwować wzrost wartości MPE do 41%. Efekt ten jednak zanika w ostatnim przedziale czasowym. Znacznie mniejsze zróżnicowanie jeżeli chodzi o wartości MPE zaobserwowano u linii LA. Największe wartości MPE wynosiły 23,9 i 24,4% MPE odpowiednio w 15 i 30 min. badania, natomiast najniższe 13,7 i 5,3% MPE. Niskie zróżnicowanie w poziomie analgezji wywołanej AA2016 zaobserwowano także u myszy K. Wartości te plasowały się od 16,4 do -4,9% MPE (Tabela1).

Jeżeli selekcjonowane myszy, wykazują różny poziom analgezji w obrębie własnej linii zawartość badanego związku w ich mózgach musi też być różna. W tym celu przeprowadzono badanie mające na celu identyfikację związku AA2016 w mózgach selekcjonowanych linii myszy wykazujących wysoką i niską analgezję na badany peptyd.

Od zwierząt z poszczególnych linii, wykazujących możliwie najwyższą i najniższą analgezję po zastosowaniu AA2016, pobrano mózgi a następnie przy pomocy metody HPLC podjęto próbę identyfikacji związku AA2016 w mózgach myszy (Ryc.37). Okazało się, że poziom analgezji jest ściśle związany z zawartością związku w mózgu. U zwierząt linii HA wykazujących wysoki poziom analgezji po zastosowaniu AA2016 zidentyfikowano największą ilość związku AA2016, natomiast u zwierząt z tej samej linii wykazujących słabą analgezję zawartość peptydu w mózgu była znacznie mniejsza. W związku z tym, że różnice w wartości MPE u myszy linii LA i K, nie były zbyt duże to zawartość peptydu w ich mózgach była na podobnym poziomie. Znacznie większa zawartość peptydu AA2016 w mózgu myszy linii HA niż LA i K jest potwierdzeniem na to, że u linii HA BBB jest bardziej przepuszczalna dla obwodowo podawanego peptydu. W związku z tym, że zastosowana dawka peptydu opioidowego była dosyć niska nie wszystkie zwierzęta linii HA na nią zareagowały. Jednakże efekt analgetyczny jest ściśle skorelowany z zawartością związku w mózgu.

Tabela 3. Najniższe i najwyższe wartości MPE u selekcionowanych inii myszy po obwodowym podaniu AA2016.

Linia myszy	%MPE		
	czas	Wysoka analgezia	Niska analgezia
HA	5	53	11,7
	15	60,2	23,8
	30	70,8	5,5
	60	76,0	41,0
	120	66,8	-7
LA	5	16,4	16,8
	15	23,9	13,7
	30	24,4	5,3
	60	16	23
	120	18,2	5,5
K	5	-5,0	-1,8
	15	1,6	2,0
	30	1,1	0,4
	60	16,4	-4,9
	120	0,1	2,4



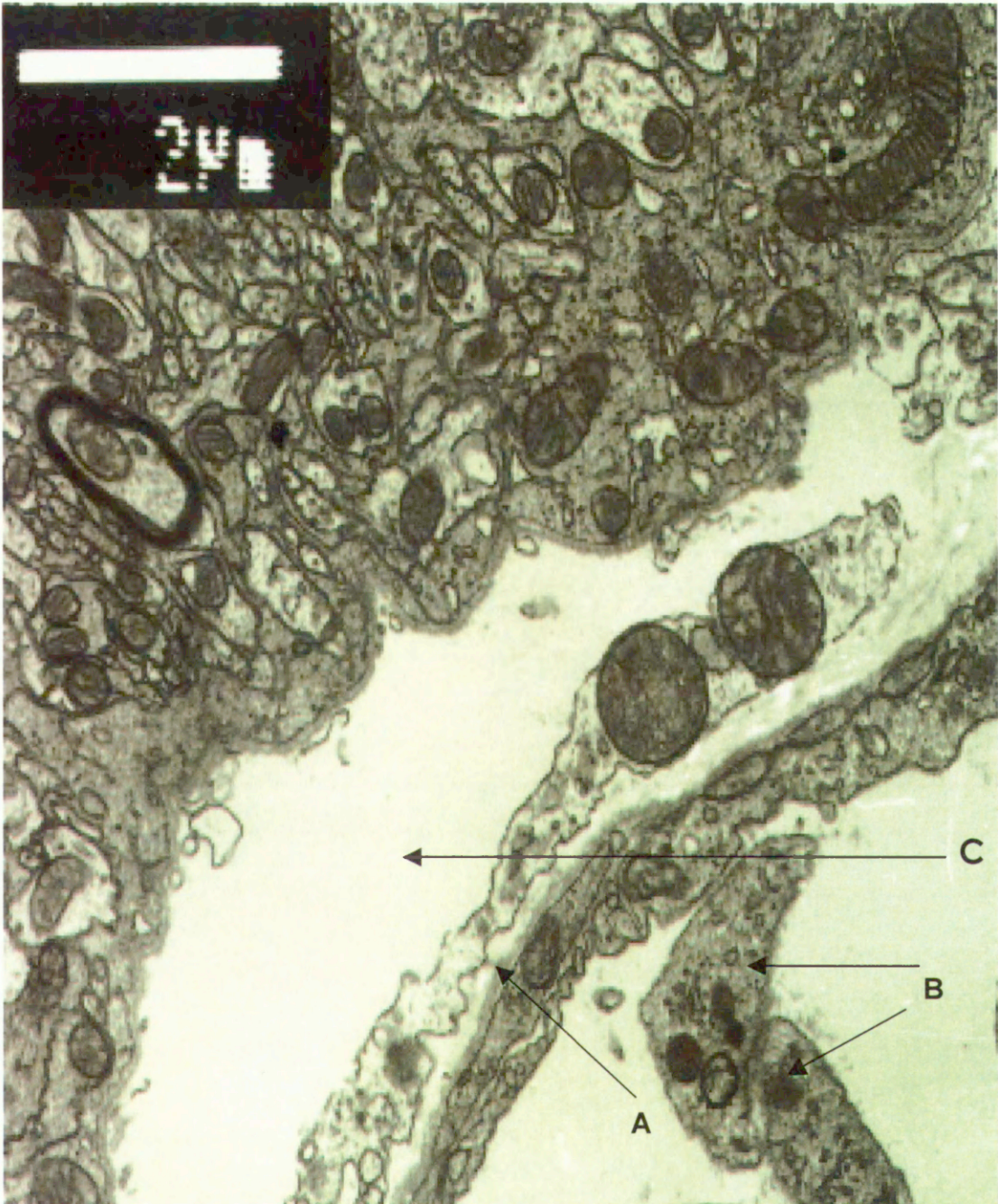
Ryc. 37. Poziom fluorescencji AA2016 w mózgach HA, LA, K .

## 12. Badania mikroskopowe bariery krew-mózg

Postawiona na wstępie pracy hipoteza, zakłada, że zróżnicowana reakcja na stres czy ból pomiędzy selekcjonowanymi liniami myszy może wynikać ze zmian w przepuszczalności bariery krew- mózg dla endogennie wydzielanych opioidów, których wzrost we krwi obwodowej obserwuje się po zaistnieniu sytuacji stresowej. Możliwe istnienie różnic w przepuszczalności BBB u badanych zwierząt potwierdziły zarówno badania *in vivo* jak i badania mające na celu porównanie zawartości podawanego obwodowo peptydu w mózgach selekcjonowanych linii myszy. Dlatego też końcowym etapem pracy było ostateczne potwierdzenie postawionej na początku hipotezy, a mianowicie wykazanie zmian w morfologii BBB na podstawie badań mikroskopowych.

Badania ultrastruktury BBB przeprowadzono w Zakładzie Ultrastruktury Komórki IMDiK PAN w Warszawie. Otrzymane wyniki wykazały jednoznacznie że, u linii HA oprócz prawidłowych struktur komórkowych występują liczne struktury zmienione patologicznie. Jedną z najbardziej charakterystycznych zmian różnicujących linię HA od linii LA jest brak ścisłych połączeń komórkowych (Ryc.40, 42, 43) przez co śródbłonek jest rozluźniony i świadczy o zaburzeniu integralności BBB. Cechą świadczącą o zaburzeniu BBB jest także obrzęk okołonaczyniowy zaciskający światło naczynia ( Ryc.38, 39, 40, 42, 43).

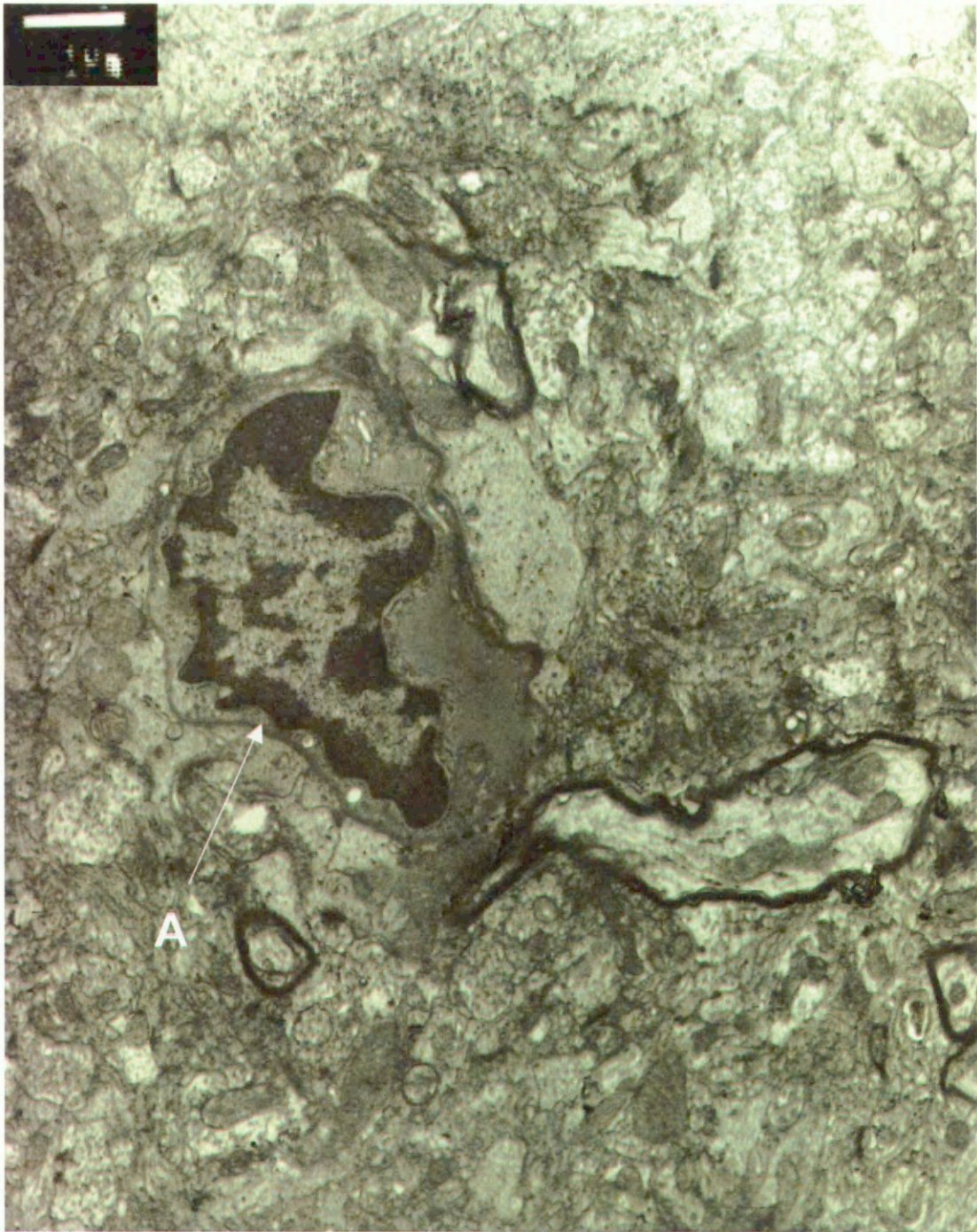
U linii LA i K zaobserwowano znacznie mniej form patologicznych. Błona podstawna jak i połączenia komórkowe są prawidłowe (Ryc. 44, 47).



Ryc. 38. Bariera krew-mózg - linia wysokoanalgetyczna (HA).

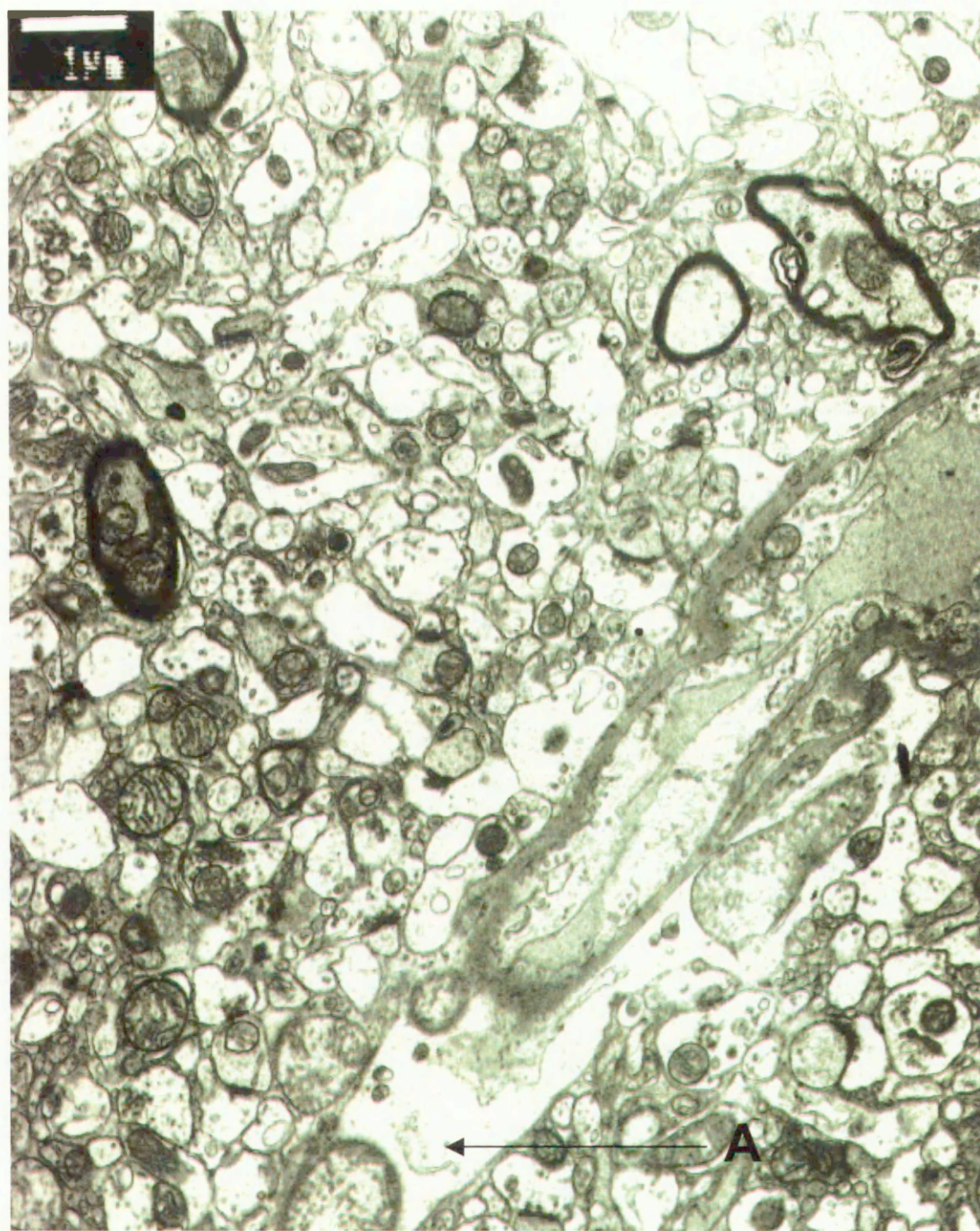
- A. błona podstawna
- B. płytki krwi w ścisłym kontakcie z komórkami śródbłónka
- C. prawdopodobny obrzęk wypustki astrocytu





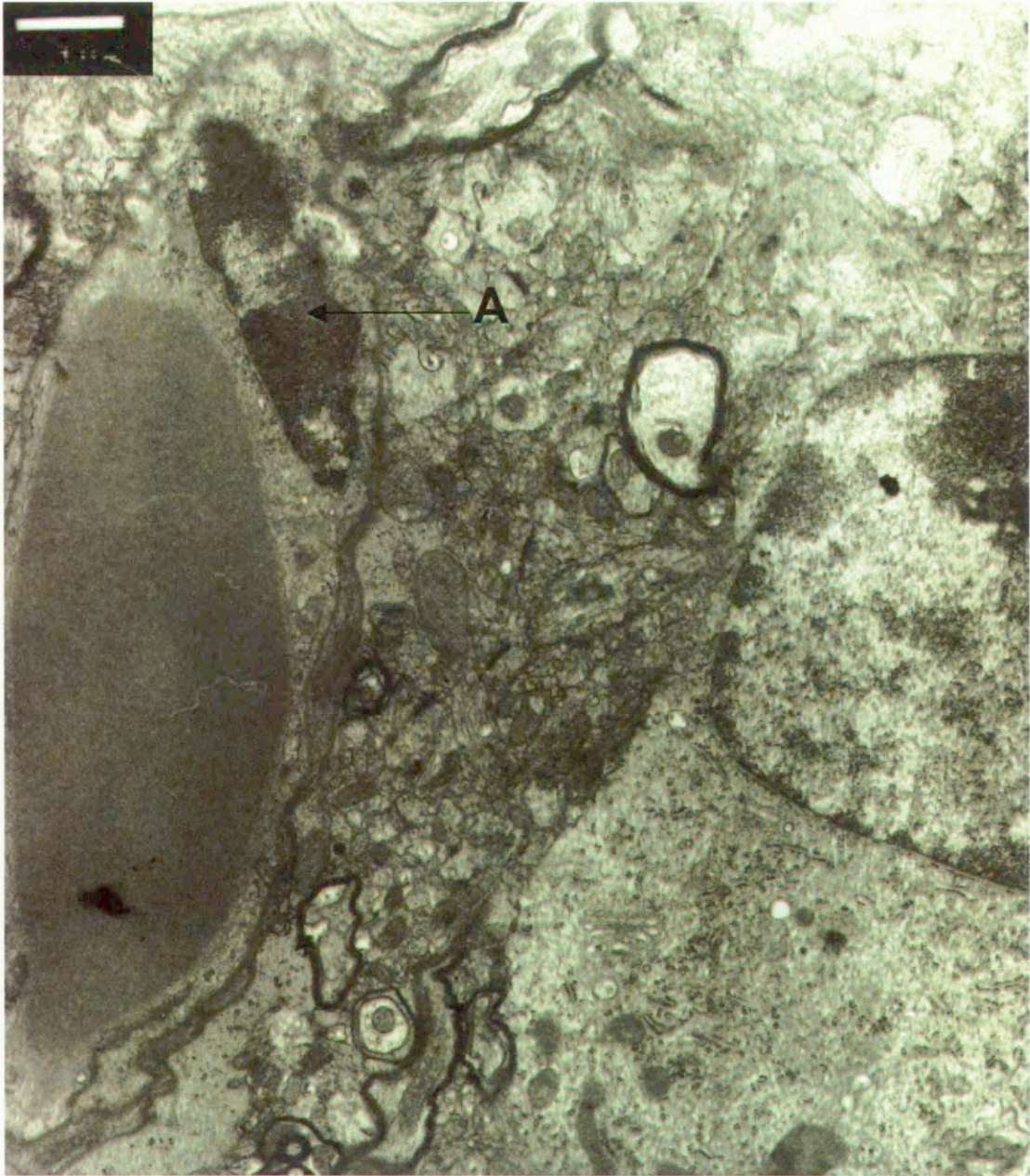
Ryc.39. Bariera krew-mózg - linia wysokoanalgetyczna (HA). Komórka śródbłonna z cechami apoptozy.

A. zwężone światło kapilary



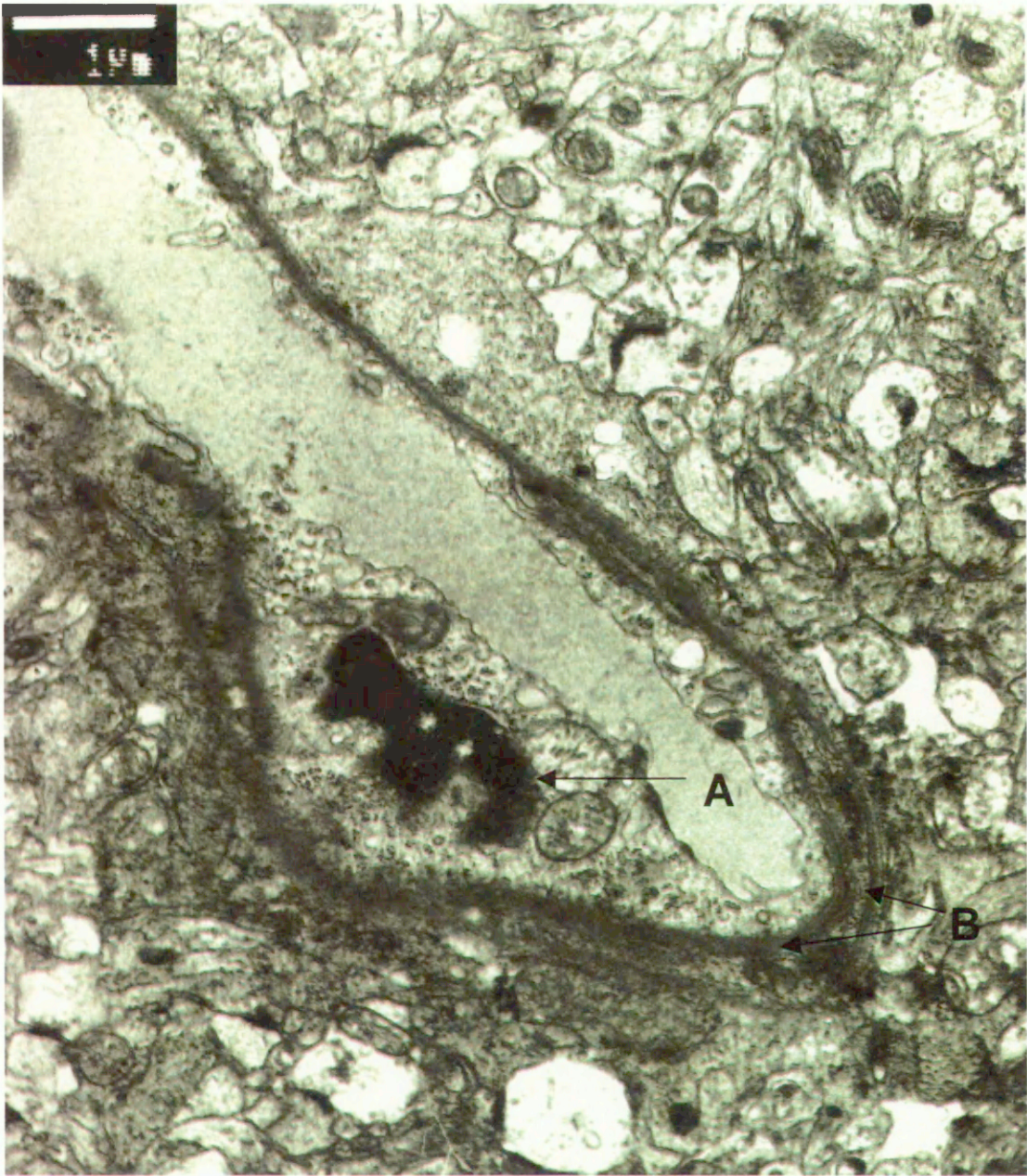
Ryc. 40. Bariera krew-mózg - linia wysokoanalgetyczna (HA).

- A. prawdopodobny obrzęk wypustki astrocytu
- brak ścisłych połączeń



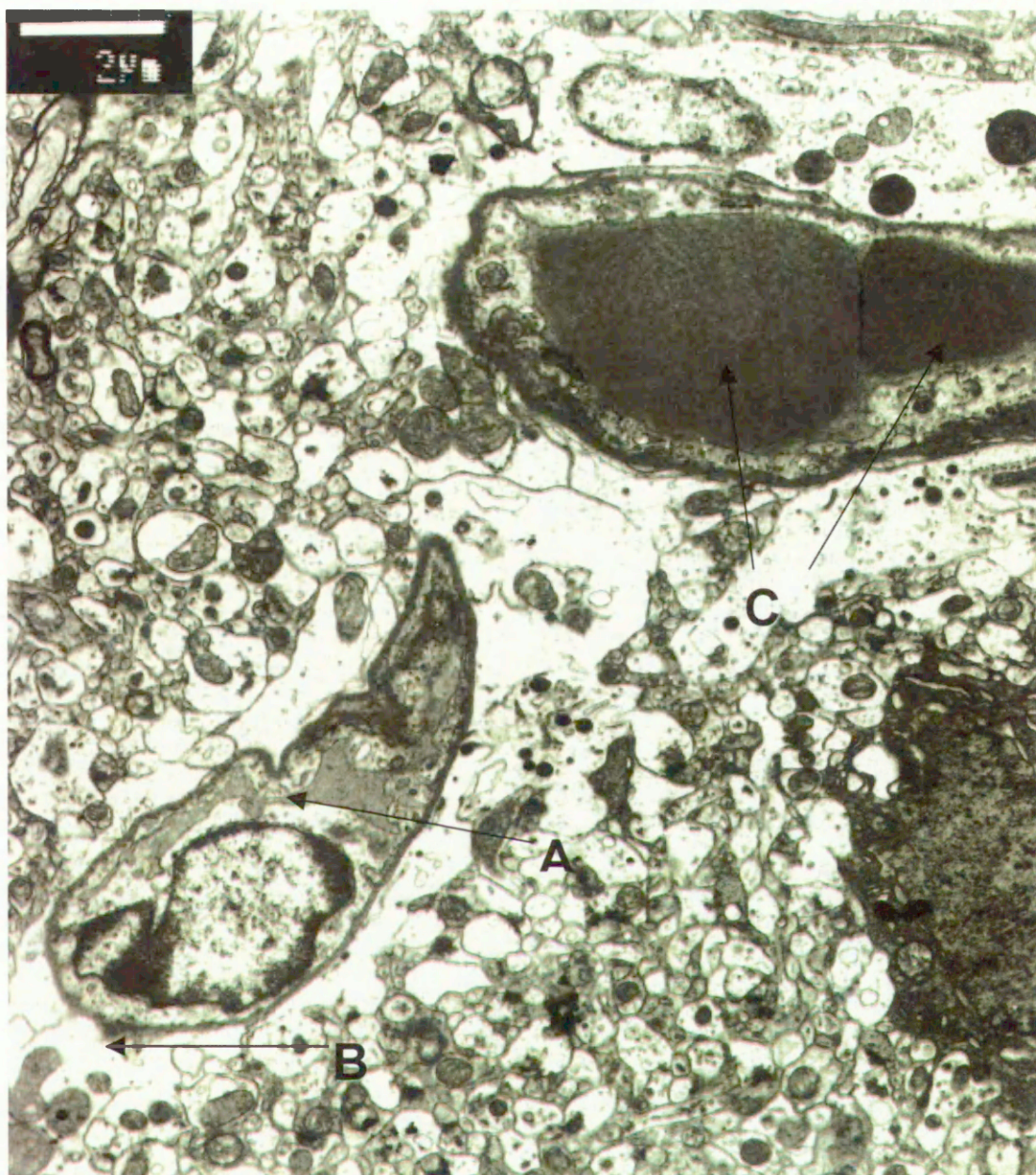
Ryc. 41. Bariera krew-mózg - linia wysokoanalgetyczna (HA). Komórka śródbłonna o cechach apoptozy w jądrze.

A. jądro apoptotyczne



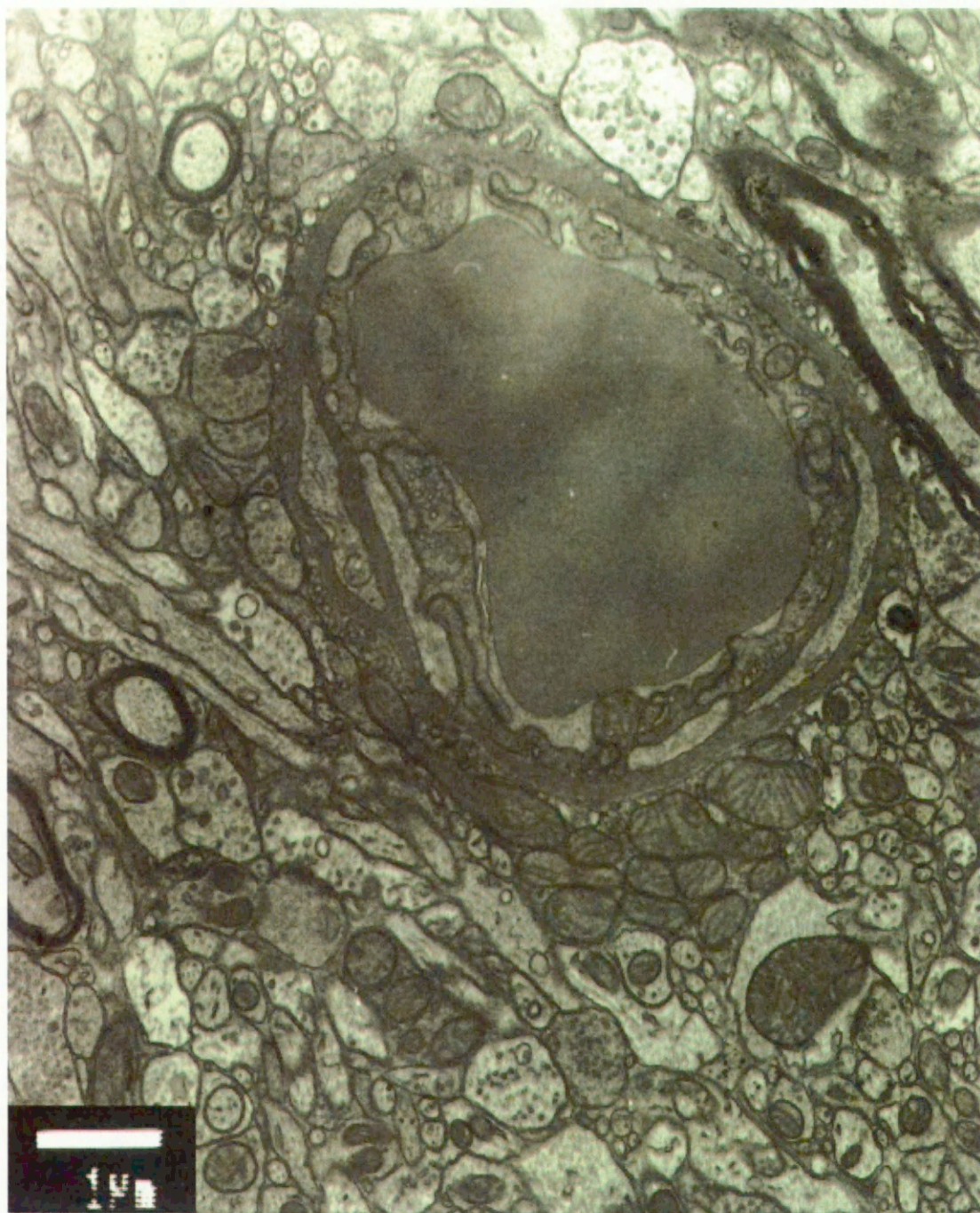
Ryc. 42. Bariera krew-mózg - linia wysokoanalgetyczna (HA). Komórka śródbłonna z nieprawidłową ultrastrukturą jądra komórkowego.

- A. jądro apoptotyczne
- B. pogrubiała błona podstawna  
brak ścisłych połączeń

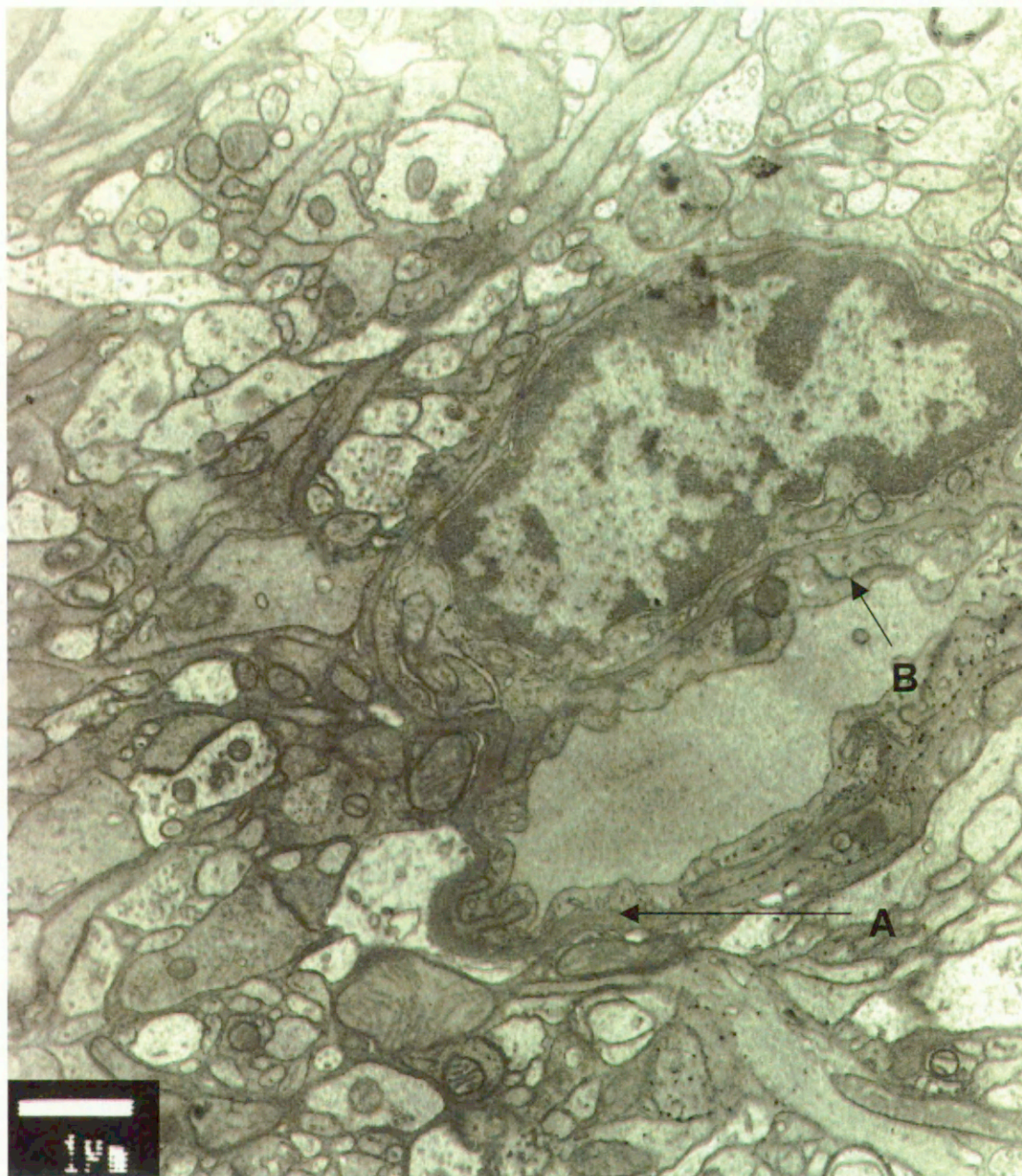


Ryc. 43. Bariera krew-mózg - linia wysokoanalgetyczna (HA).

- A. zwężenie światła naczynia
- B. obrzęk okołonaczyniowy
- C. erytrocyty w świetle naczynia

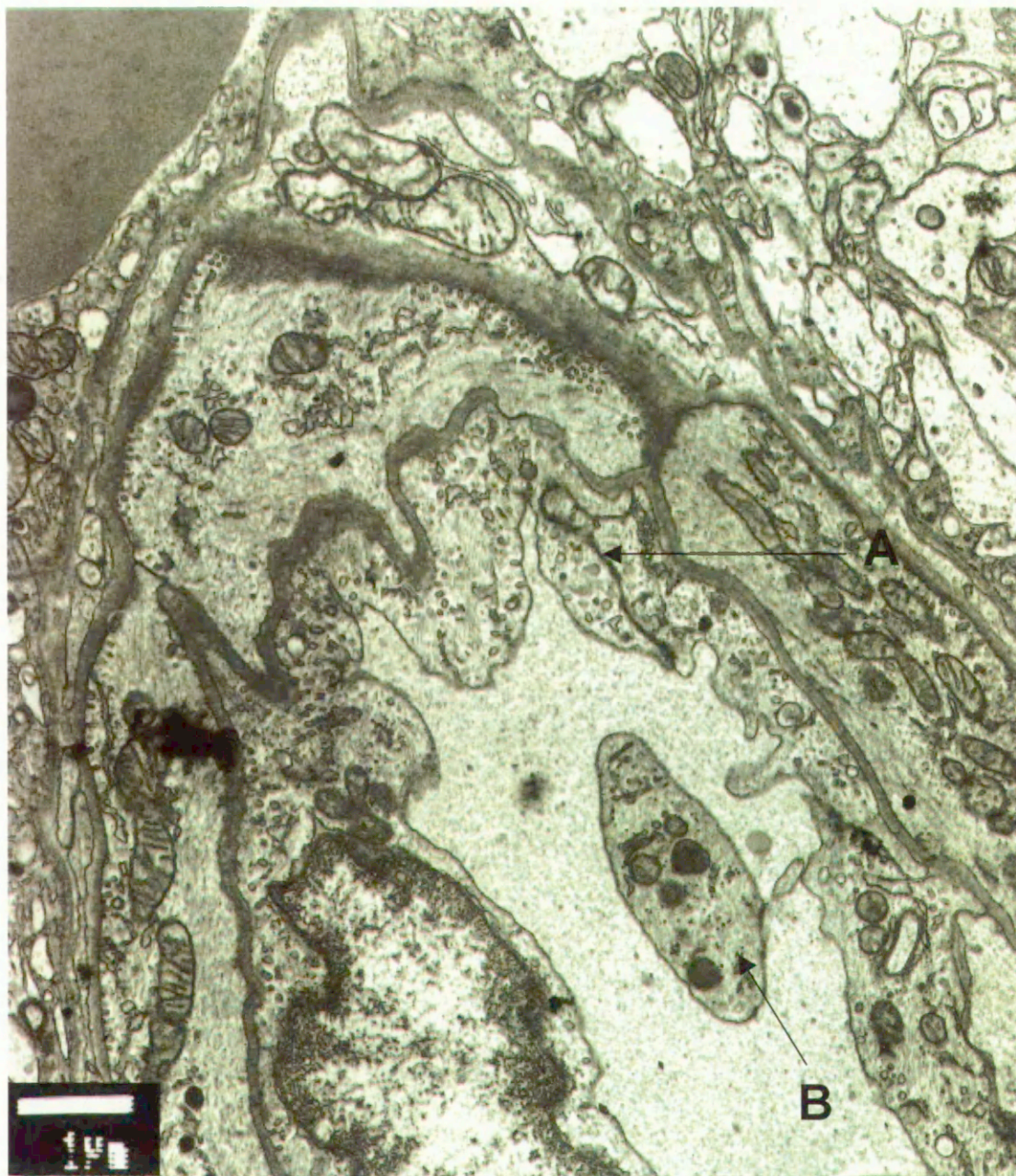


Ryc. 44. Bariera krew-mózg - linia niskoanalgetyczna (LA). Prawidłowy obraz ultrastruktury naczynia włosowatego.



Ryc. 45. Bariera krew-mózg - linia niskoanalgetyczna (LA).

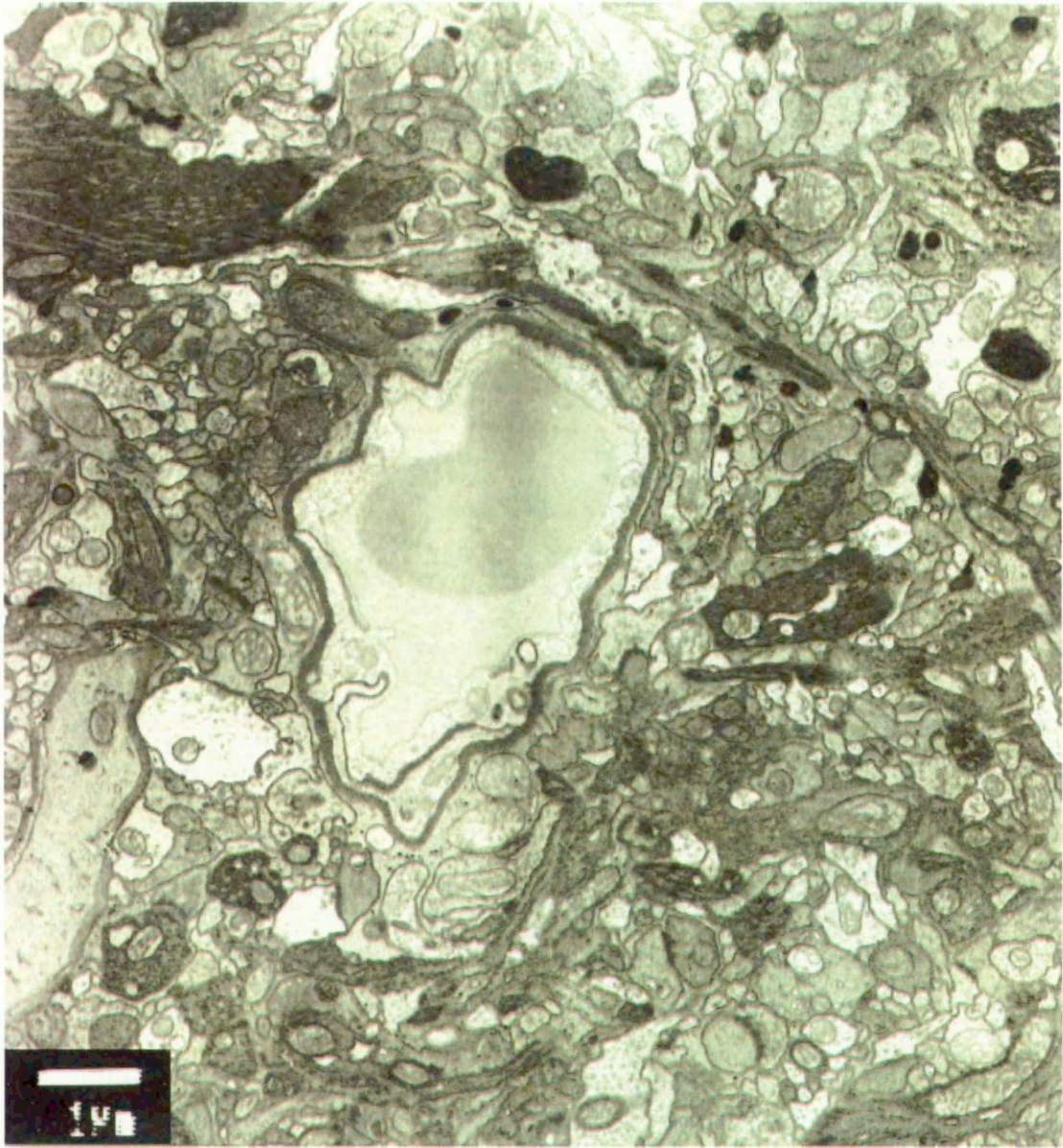
- A. błona podstawna o prawidłowej budowie
- B. ścisłe połączenia komórek śródbłonka



Ryc. 46. Bariera krew-mózg - linia kontroina (K).

- A. ściste połączenia komórkowe
- B. płytkę krwi w świetle naczynia





Ryc. 47. Bariera krew-mózg - linia kontrolna (K). Prawidłowe naczynie włosowate.

### 13. Dyskusja

Ból jest niezbędnym elementem funkcjonowania organizmu, ponieważ sygnalizuje powstawanie lub istnienie stanów patologicznych. Obserwacje kliniczne pokazują, że ból jest zawsze zjawiskiem subiektywnym, gdyż odczuwanie bodźców bólowych u każdego człowieka jest uzależnione w dużym stopniu od progu czucia i tolerancji bólu, wcześniejszych doświadczeń bólowych czy też różnych czynników kulturowo- środowiskowych (Nielsen C.S. i wsp. 2009). Wrażliwość na ból w dużej mierze zależy także od płci, co wykazano w badaniach z udziałem ludzi i zwierząt doświadczalnych. Badania te wykazały także, że u kobiet próg czucia bólu zmienia się w zależności od fazy cyklu płciowego czy też w okresie ciąży (Berkley K.J., 1997).

Wrażliwość na ból jest uwarunkowana genetycznie (Mogil J.S. i wsp. 1996). Rozwój inżynierii genetycznej a także zastosowanie odpowiednich metod hodowli zwierząt laboratoryjnych przyczyniły się do stworzenia modeli zwierzęcych charakteryzujących się różną wrażliwością na ból (Mogil J.S. 1999). Są to szczepy wsobne, krzyżówki międzyszczepowe lub zwierzęta pozbawione wskutek manipulacji genetycznych danego genu tzw. knock-out. Wśród dostępnych szczepów wsobnych należy wymienić myszy ob/ob z nadmiernie wysokim poziomem  $\beta$ -endorfiny w przysadce, wykazujące wysoki próg bólu. Krzyżowanie myszy pochodzących z różnych szczepów wsobnych pozwala na wyprowadzenie linii zwierząt o różnej gęstości receptorów opioidowych, mniej lub bardziej wrażliwych na morfinę. Inną grupę zwierząt stanowią myszy pozbawione genu kodującego białka istotne dla procesu nocycypcji. U myszy pozbawionych genu kodującego białko receptora *mu*, podanie morfiny nie wywołuje analgezji (Mogil J.S. i wsp., 1996; Mogil J.S. i wsp. 1999).

Prof. B. Sadowski zapoczątkował hodowlę myszy ze zmienioną wrażliwością bólową po zastosowaniu czynnika stresowego, polegającą na kojarzeniu osobników wyselekcjonowanych pod kątem niskiej lub wysokiej analgezji wywołanej stresem. Zwierzęta te różnią się istotnie pod względem poziomu analgezji spowodowanej zaistnieniem sytuacji stresowej (Panocka I.

i wsp. 1986), jednak do tej pory nie udało się w pełni wyjaśnić mechanizmów warunkujących i różnicujących odczucie bólu u selekcionowanych linii zwierząt.

Przeprowadzone badania własne potwierdziły wcześniejsze wyniki badań, że myszy linii HA i LA wykazują skrajne różnice pod względem poziomu analgezji wywołanej stresem (Panocka I. i wsp. 1986). Myszy linii HA po zastosowaniu stresora w postaci 3 minutowego wymuszonego pływania wykazują analgezję na poziomie 70% MPE, natomiast u myszy LA analgezja jest znacznie słabsza (Ryc.25). Uzyskane dane potwierdzają wyniki badań Panockiej i wsp., gdzie myszy HA wykazywały analgezję na znacznie wyższym poziomie po zastosowaniu czynnika stresowego niż linia LA (Panocka i. i wsp. 1986). Doświadczenia prowadzone na zwierzętach selekcionowanych pod kątem wysokiej i niskiej analgezji postresowej, pochodzących od 65 do 70 pokolenia potwierdzają fakt, że selekcionowana cecha jest cechą dziedziczną i jest przekazywana z pokolenia na pokolenie w obrębie danej linii. (Panocka i wsp. 1986). W związku z tym, że badania Kest'a i wsp. (Kest B. i wsp.,1999) nie wykazały istotnych różnic pod względem gęstości receptorów *mu* pomiędzy linią HA i LA, a także wykluczono istnienie różnic w polifirmizmie receptora *mu* (dane niepublikowane) a tym samym wykluczono istnienie różnic związanych z poziomem aktywności układów opioidergicznych u selekcionowanych linii myszy, postawiono hipotezę, że mechanizmem warunkującym różny poziom analgezji wywołanej stresem są różnice w przepuszczalności BBB dla endogennych opioidów uwalnianych podczas stresu.

Jak wspomniano na wstępie wrażliwość na ból a także na stres czy leki przeciwbólowe jest sprawą bardzo indywidualną i może zależeć od wielu czynników. Jednym z tych czynników jest własny próg bólu. Określenie progu bólu znacznie by ułatwiło np. określenie stopnia działania leków przeciwbólowych. Wykazano, że ludzie cierpiący na tę samą jednostkę chorobową w bardzo różny sposób oceniają odczuwany ból. Zmierzenie progu bólowego przed wystąpieniem schorzenia, znacznie ułatwiłoby ocenę

zastosowanego leczenia i pozwoliłoby przewidzieć efekt przeciwbólowy podawanych leków. Jednakże istotną przeszkodą w praktyce klinicznej, uniemożliwiającą w pełni przewidzenie efektu przeciwbólowego zastosowanego analgetyku jest fakt, że pacjenci zgłaszają się do lekarza już z istniejącym bólem co uniemożliwia określenie progu bólu przed wystąpieniem danego schorzenia (Nielsen C.S. i wsp., 2009).

Badania Panockiej i wsp. wskazują, że selekcjonowane linie myszy oprócz tego, że różnią się poziomem analgezji wywołanej stresem posiadają także różny próg bólu (Panocka I. i wsp., 1986). W przeprowadzonych badaniach własnych próg bólu u selekcjonowanych myszy mierzono zarówno przed jak i po podaniu związków o charakterze przeciwbólowym czy zastosowaniu stresora. Okazało się, że zarówno myszy HA jak i LA czy K miały podobny próg bólu mierzony testem cofania ogona i wyniki te nie korelują z wcześniejszymi badaniami. W związku z tym, że badania własne prowadzono na zwierzętach należących od 65 do 70 pokolenia a Panocka i wsp. prowadził badania na zwierzętach z 5- 6 pokolenia wydaje się, że wielopokoleniowa selekcja, trwająca ponad 25 lat, doprowadziła do wyrównania progów bólu u selekcjonowanych linii a różnice w tych wartościach były widoczne tylko na początku selekcji.

W leczeniu bólu szerokie zastosowanie znalazły związki opioidowe dzięki wysokim właściwościom przeciwbólowym. Ich mechanizm związany jest z działaniem na receptory opioidowe typu *mu*, *delta*, *kappa*, które zlokalizowane są w mózgu, rdzeniu kręgowym a także w tkankach obwodowych. Działanie farmakologiczne opioidu zależy od drogi podania oraz od jego właściwości. Z miejsca podania (*p.o.*, *s.c.*, *i.m.*, *i.v.*, zewnątrzoponowo, podpajęczynówkowo) opioidy muszą przedostać się do miejsca swojego działania (mózg, rdzeń kręgowy, tkanki obwodowe). Muszą więc pokonać wiele barier anatomicznych i czynnościowych. To czy opioid dotrze do mózgu w dużej mierze zależy od jego zdolności do pokonania bariery krew- mózg. (Krajnik M., Żylicz Z. 2003).

Peptydy opioidowe są związkami o silnych właściwościach przeciwbólowych. Wykazują aktywność po podaniu bezpośrednio do OUN, jednakże po podaniu obwodowym ich aktywność jest znacznie obniżana, głównie w wyniku trudności z przechodzeniem przez BBB (Egleton R.D. i wsp., 1997). Poza tym peptydy podlegają rozkładowi enzymatycznemu przez peptydazy, co znacznie zmniejsza ich właściwości terapeutyczne. W związku z tym dąży się do syntezy takich związków, których struktura umożliwiłaby przechodzenie przez BBB i zwiększałaby odporność na rozkład enzymatyczny wraz z zachowaniem ich właściwości przeciwbólowych (Witt A.K. i wsp., 2001). W celu potwierdzenia wcześniej postawionej hipotezy mówiącej o możliwym istnieniu różnic w przepuszczalności BBB u selekcyonowanych myszy, wydawało się słuszne oszacowanie tych różnic na podstawie efektu analgetycznego związków opioidowych w różnym stopniu przechodzących przez BBB. Obserwacja różnic w hamowaniu odruchów bólowych u selekcyonowanych zwierząt, po obwodowym podaniu związku opioidowego pozwalałaby na wykazanie różnic w przepuszczalności BBB.

Modelem opioidem jest morfina, która w związku z tym, że nie jest peptydem lecz alkaloidem nie podlega degradacji przez peptydazy i wykazuje swoje działanie przeciwbólne zarówno po podaniu obwodowym jak i bezpośrednio po podaniu do OUN (W. Kostowski red. 1998, 2001). Wcześniejsze badania wykazały, że selekcyonowane linie myszy odpowiadają na morfinę w bardzo różny sposób tzn. linia HA była na morfinę znacznie bardziej wrażliwa niż linia LA (Lutfy K. i wsp. 1996). Wykazano także, że w celu osiągnięcia takiego samego efektu analgetycznego dawka morfiny musi być znacznie wyższa u linii LA niż u linii HA (Lutfy K. i wsp., 1996). Świadczyłoby to o różnicach w poziomie aktywności układu opioidergicznego, co jednak zostało wykluczone (Kest B. i wsp. 1999). Przeprowadzone badania własne wykazały jednak brak różnic w poziomie analgezji morfinowej u selekcyonowanych linii myszy. Zarówno myszy linii HA jak i LA na morfinę odpowiadały podobnie i wynik ten potwierdza brak różnic w aktywności układu opioidergicznego (Ryc.19). W związku z tym, że morfina jest związkiem przechodzącym przez BBB nie jest możliwa ocena różnic w

przepuszczalności BBB na podstawie jej efektu analgetycznego. Jednakże uzyskany efekt pozwala stwierdzić, że wielopokoleniowa selekcja myszy na daną cechę doprowadziła do ujednoczenia aktywności układu opioidowego i zastosowana dawka morfiny wywołuje taki sam poziom analgezji u linii HA i LA. Selekcjonowanie zwierząt w kierunku niskiej i wysokiej analgezji postresowej spowodowało, że widoczna na początku różnica we wrażliwości na morfinę pomiędzy dwoma liniami myszy, uległa zatarciu (Panocka I. i wsp. 1986).

Badania prowadzone nad syntezą związku, który wykazywałby efekt centralny po podaniu obwodowym i byłby mniej podatny na rozkład enzymatyczny wraz z zachowaniem silnych właściwości przeciwbólowych, którym nie towarzyszą efekty uboczne, doprowadziły do opracowania struktury peptydowego związku opioidowego - bifaliny, (Lipkowski A.W. i wsp., 1982, Silbert B.S. i wsp., 1991). Bifalina wywołuje silny efekt analgetyczny po podaniu i.t. i słabszy po podaniu i.v. Zastosowanie bifaliny a także jej analogu AA2016, umożliwiło ocenę stopnia przepuszczalności BBB dla tych peptydów u selekcjonowanych linii myszy. Uzyskane wyniki wykazały, że bifalina oraz jej analog AA2016 wykazują działanie zarówno u myszy linii HA jak i LA, jednakże efekt u linii HA jest znacznie silniejszy (Ryc.20, Ryc.28). W związku z tym, że bifalina jak i jej analog, dzięki opracowanej strukturze są związkami częściowo przechodzącymi przez BBB, fakt, że wywołują analgezję u obu linii myszy nie powinien dziwić. Jednak porównując poziom uzyskanej analgezji u selekcjonowanych linii myszy wydaje się, że bifalina w większym stopniu przenika po podaniu dożylnym do OUN u myszy HA, co może wskazywać na możliwe zwiększenie przepuszczalności BBB dla tego związku u tej linii zwierząt (Ryc.28).

Skoro zastosowanie związków charakteryzujących się częściowym przechodzeniem przez BBB wykazało różnice w poziomie analgezji u selekcjonowanych linii myszy a tym samym wyniki te wskazywały na możliwe istnienie różnic w przepuszczalności BBB pomiędzy selekcjonowanymi liniami myszy dla podanego związku, postanowiono określić stopień

przepuszczalności BBB u tych zwierząt dla peptydu opioidowego – EM-1. EM-1 jest krótkim peptydem szybko podlegającym degradacji w wyniku działania enzymów- peptydaz, i wykazuje efekt analgetyczny tylko po bezpośrednim podaniu do OUN (Peter A. i wsp. 1999). Okazało się, że obwodowe podanie EM-1 wywołało niewielką acz widoczną analgezję tylko u myszy linii HA (Ryc.33). Fakt, że EM-1 hamuje odruchy cofania ogona u linii HA świadczy o zwiększonej przepuszczalności BBB dla tego peptydu. U linii selekcyjowanej pod kątem niskiej analgezji LA, EM-1 nie wywołała praktycznie żadnej analgezji, natomiast u zwierząt nieselekcyjowanych obwodowe podanie tego związku wywołało wręcz hiperalgezję. Porównując dane uzyskane w badaniach efektu analgetycznego obwodowo podanej EM-1 u trzech linii myszy można stwierdzić, że wielopokoleniowa selekcja doprowadziła do pewnych zmian prowadzących do zwiększenia przepuszczalności BBB u linii HA.

U ok. 30% populacji ludzi stwierdzono istnienie zjawiska zwanego analgezją wywołaną stresem. Oznacza to, że u tych ludzi samo zaistnienie sytuacji stresowej wywołuje analgezję i pomimo rozległych uszkodzeń ciała czy złamań nie wykazują oni zapotrzebowania na środki przeciwbólowe (Sadowski B. 2006). Wykazano także, że stres może istotnie wpływać na efekt przeciwbólowy zastosowanych leków np. u zwierząt poddanych działaniu czynników stresowych zaobserwowano znaczne zmniejszenie efektu przeciwbólowego  $\beta$ - endorfiny czy morfiny (Hawranko A.A. i wsp. 1999a; Hawranko A.A. i wsp. 1999b). Związane jest to ze zwiększonym uwalnianiem w stresie CCK, która zmniejsza skuteczność zastosowanej morfiny czy  $\beta$ - endorfiny (Hawranko A.A. i wsp., 1999). Badania ostatnich lat wykazały także, że stres może istotnie wpływać na zaburzenie integralności BBB a tym samym zwiększać jej przepuszczalność (De Lange E.C.M. i wsp. 1995; Skultetyova I. i wsp. 1998; Belova T.I. i wsp. 1992; Oztas B. i wsp. 1985).

Myszy selekcyjowane pod kątem wysokiej i niskiej analgezji postresowej różnią się istotnie poziomem analgezji po zastosowaniu bodźca

stresowego w postaci wymuszonego pływania. Jeżeli stres może z jednej strony zmieniać efekt analgetyczny zastosowanego leku, a z drugiej strony może wpływać na rozszczelnienie BBB, postanowiono określić wpływ stresu na efekt analgetyczny wcześniej omówionych związków opioidowych u selekcyonowanych linii myszy.

Badania przeprowadzone przez Maszczyńską i wsp. wykazały, że jednoczesne podawanie morfiny ze związkami opioidowymi o różnym powinowactwie do receptorów opioidowych prowadzi do nasilenia lub osłabienia efektu analgetycznego morfiny, a efekt ten jest zależny od wysokości zastosowanej dawki alkaloidu (Maszczyńska I i wsp. 1994). Dlatego też, proponowanym mechanizmem warunkującym zwiększenie aktywności przeciwbólowej obwodowo podawanych peptydów opioidowych u myszy HA, poddanych działaniu czynnika stresowego są interakcje jakie zachodzą pomiędzy egzogennie podawanymi związkami a opioidami endogennymi, uwalnianymi podczas stresu. Rozszczelnienie BBB u tych zwierząt umożliwia opioidom, zarówno egzogennym jak i endogennym przechodzenie do OUN, a następnie działając poprzez receptory opioidowe wykazać sumaryczny efekt przeciwbólowy, potęgując efekt analgetyczny. U zwierząt linii LA, szczelna BBB ogranicza dostęp do OUN, a tym samym uniemożliwia wystąpienie efektu addytywnego (Ryc. 48).

Jak wspomniano wcześniej zastosowanie stresora w postaci wymuszonego pływania wywołuje wysoką u linii HA i niską u linii LA analgezję. Choć morfina u linii HA poddanej działaniu czynnika stresowego wykazuje znacznie wyższy efekt niż u zwierząt niestresowanych, to w przypadku linii LA efekt jest odwrotny (Ryc.25,26). W związku z tym, że analgezja wywołana stresem jest zjawiskiem krótkotrwałym, uzyskane wyniki wykazały, że zastosowanie stresora nie tylko potęguje analgezję morfinową u linii HA ale także wydłuża czas jej trwania. Na uwagę zasługuje fakt, że morfina zarówno u linii HA jak i u LA wywołuje analgezję na podobnym poziomie, jednak zastosowanie stresora w postaci wymuszonego pływania znacznie obniża jej efekt u linii LA. Potwierdzają to dane, mówiące o



redukującym wpływie układu CCK na efekt analgetyczny morfiny podczas sytuacji stresowej (Hawranko A.A. i wsp. 1999). Fakt, że morfina wywołuje znacznie wyższy efekt analgetyczny u myszy HA poddanych działaniu czynnika stresowego może świadczyć, o istnieniu interakcji pomiędzy egzogennie podawaną morfina a opioidami endogennymi wydzielanymi w stresie. Związki te przenikają do OUN i oddziałując poprzez receptory opioidowe wykazują efekt addytywny co może świadczyć o istnieniu zmian w budowie BBB mających wpływ na jej przepuszczalność. Podobną sytuację zaobserwować można w przypadku zwierząt nieselekcjonowanych, gdzie morfina jest także bardziej aktywna u zwierząt wystawionych na działanie czynnika stresowego (Ryc.27).

Jeżeli stres w postaci wymuszonego pływania uwidacznia zmiany przepuszczalności BBB u linii HA, wymuszone pływanie powinno także wpłynąć na wzrost poziomu analgezji wywołanej EM-1. Ponownie jak w poprzednim doświadczeniu okazało się, że stres w postaci wymuszonego pływania potęguje działanie EM-1 u linii HA i K (Ryc 35,37). Efekt ten jest nie tylko podbity ale można ponownie zauważyć przedłużony czas trwania analgezji po podaniu EM-1. Wyniki tych badań świadczą, że BBB myszy linii HA jest bardziej przepuszczalna dla endogennych opioidów uwalnianych do krwi obwodowej po zastosowaniu stresora w postaci wymuszonego pływania. Zmiany w budowie BBB zwiększają dostępność w OUN zarówno EM-1 jak i endogennych opioidów, umożliwiając wystąpienie efektu addytywnego. Uzyskane dane mogą potwierdzać postawioną na początku hipotezę, iż to zmiany w przepuszczalności BBB dla endogennie uwalnianych w czasie stresu opioidów, są główną cechą różnicującą selekcjonowane linie myszy.

Do tej pory przeprowadzono wiele badań, które wykazały, że zastosowanie stresora wpływa na zwiększenie przepuszczalności BBB zarówno u ludzi jak i u zwierząt doświadczalnych (Hanin, I., 1996, Esposito, P. i wsp., 2001). Sharma i Dey wykazali, że stres wynikający z unieruchomienia przez 8 godzin powoduje u młodych szczurów zwiększenie przepuszczalności BBB (Sharma, H.S., Dey, P.K., 1986). Natomiast

Skultetyova wykazała, że krótkotrwały stres wynikający z unieruchomienia także powoduje zmiany w BBB (Skultetyova i wsp. 1998). Wykazano, że stres wywołany bólem pooperacyjnym istotnie wpływa na zmiany w przepuszczalności BBB (Oztas B. 2004).

Uszkodzenie tkanek oprócz tego, że wywołuje ból, powoduje stres. Wykazano, że podanie formaliny prowadzi do wzrostu poziomu  $\beta$ -endorfin w osoczu krwi odwodowej (Aloisi A.M. i wsp. 1995). Formalina ma działanie dwufazowe: w pierwszej fazie imituje ból ostry, natomiast w drugiej fazie mamy do czynienia z bólem związanym z rozwijającym się stanem zapalnym (Lutfy K. i wsp. 1996). Jeżeli selekcyonowane linie myszy są wrażliwe na działanie stresora w postaci wymuszonego pływania, postanowiono sprawdzić ich reakcję na dootrzewnowe podanie roztworu formaliny a także wpływ tego stresora na efekt analgetyczny bialiny. Dootrzewnowe podanie formaliny wywołało u linii HA analgezę silniejszą niż wymuszone pływanie (Ryc.24,29). Zastosowane stężenie roztworu formaliny (5%) a także objętość (25 $\mu$ l) nie wywołały charakterystycznych dla myszy odruchów skręcania ciała. Jednakże znacznie silniejszy efekt analgetyczny u linii HA niż u pozostałych linii świadczy o tym, że endogenne opioidy uwalniane na obwodzie po zastosowaniu tego czynnika stresowego, dzięki zwiększonej przepuszczalności BBB, mogą przedostawać się do OUN i wywoływać zwiększoną niż u pozostałych linii analgezę.

Dootrzewnowe podanie formaliny zastosowane jako rodzaj czynnika stresowego wpłynęło znacznie na efekt analgetyczny bialiny. U linii HA bialina wykazała znacznie wyższe wartości niż bialina u zwierząt niestresowanych i osiągała wartości bliskie 100% MPE (Ryc.30). Podobnie u pozostałych linii myszy zastosowanie tego stresora zwiększyło efekt analgetyczny bialiny. Należy jednak zaznaczyć, że o ile u linii HA wzrost poziomu analgezji był widoczny już w pierwszych przedziałach czasowych, to u linii LA i K narastający efekt analgetyczny widoczny był dopiero od 15- 30 min. po podaniu związku (Ryc.31, 32). Świadczy to o tym, że wzrost efektu analgetycznego bialiny można zaobserwować dopiero w drugiej fazie

działanie formaliny, związanej z rozwojem stanu zapalnego. Wykazano, że uwalniane podczas rozwoju stanu zapalnego, czynniki prozapalne wpływają na integralność BBB, prowadząc do zwiększenia jej przepuszczalności (Huber J.D. i wsp. 2001). Wyniki te potwierdzają więc, że różna reakcja selekcjonowanych linii myszy na działanie stresora czy też związków opioidowych jest wynikiem różnic w przepuszczalności BBB.

Potwierdzają to także badania *in vitro*, mające na celu określenie zawartości podawanego obwodowo peptydu opioidowego w mózgu myszy selekcjonowanych w kierunku wysokiej i niskiej analgezji postresowej. Podanie zwierzętom związku ze znacznikiem fluorescencyjnym umożliwiło identyfikację tego peptydu w mózgu zwierząt przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Otrzymane wyniki wykazały różnice w ilości zidentyfikowanego peptydu pomiędzy linią HA i LA (Ryc.37). W związku z tym, że zastosowany peptyd charakteryzuje się częściowym przechodzeniem przez BBB, zidentyfikowano go zarówno w mózgu myszy linii HA jak i LA, jednakże jego ilość była różna. Wysokie wartości MPE uzyskane u linii HA po podaniu peptydu ze znacznikiem fluorescencyjnym są ściśle skorelowane z większą zawartością tego peptydu w mózgu tych zwierząt. Natomiast niższe wartości MPE uzyskane u linii LA po podaniu tego samego związku są skorelowane z automatycznie niższą zawartością zastosowanego peptydu w mózgu myszy selekcjonowanych w kierunku niskiej analgezji. Brak efektu analgetycznego po obwodowym podaniu peptydu ze znacznikiem fluorescencyjnym zarówno u myszy HA jak i LA jest związany ze znacznie obniżoną zawartością zastosowanego peptydu w mózgu myszy, zidentyfikowanego metodą HPLC. Wyniki te poświadczają wcześniej postawioną hipotezę o różnicach w przepuszczalności BBB u selekcjonowanych myszy. To czy związek zadziała zależy od tego czy z miejsca podania przedostanie się do miejsca swojego działania. To czy opioid dotrze do mózgu w dużej mierze zależy od jego zdolności do pokonania BBB (Egleton R.D. i wsp. 1997). Różna zawartość podawanego obwodowo peptydu opioidowego w mózgu selekcjonowanych linii myszy a tym samym różny poziom analgezji wywołany podaniem tego związku

potwierdza, że selekcionowane myszy różnią się przepuszczalnością BBB dla obwodowo podawanego peptydu opioidowego.

Głównym kryterium selekcji myszy HA i LA była wysoka lub niska analgeza po zastosowaniu stresora w postaci wymuszonego pływania. Przeprowadzone badania aktywności przeciwbólowej związków opioidowych a także identyfikacja peptydu w mózgach selekcionowanych myszy wskazuje na możliwe istnienie różnic w przepuszczalności BBB pomiędzy selekcionowanymi liniami myszy. Uzyskane wyniki były przesłanką do przeprowadzenia badań mikroskopowych BBB mających na celu w pełni potwierdzić na wstępie postawioną hipotezę. Główną cechą charakterystyczną BBB jest jej integralna budowa oraz istnienie ścisłych połączeń komórkowych (Paulson O.B. 2002). Badania mikroskopowe wykazały, że w przypadku linii HA, śródbłonek tworzący BBB jest rozluźniony a pomiędzy komórkami śródbłonka brak jest charakterystycznych ścisłych połączeń (Ryc. 40, 42, 43). Poza tym, w wyniku tworzącego się obrzęku okołonaczyniowego, światło naczynia ulega zaciskaniu (Ryc.38, 39, 40, 42, 43). Obserwacje błony podstawnej wykazały, że jest ona pogrubiała, co jest wynikiem walki organizmu do zachowania za wszelką cenę stabilności naczynia (Ryc. 42). Zaobserwowane częste zmiany patologiczne w budowie BBB u myszy HA nie wpływają jednak istotnie na stan zdrowia zwierząt. Brak jest jakichkolwiek danych dotyczących ich problemów ze zdrowiem, rozmnażaniem, odchowywaniem młodych czy żywotnością. Zaobserwowane zmiany patologiczne wpływają na zwiększenie przepuszczalności BBB, jednakże nie są na tyle zaawansowane aby pogarszać stan zdrowia zwierząt.

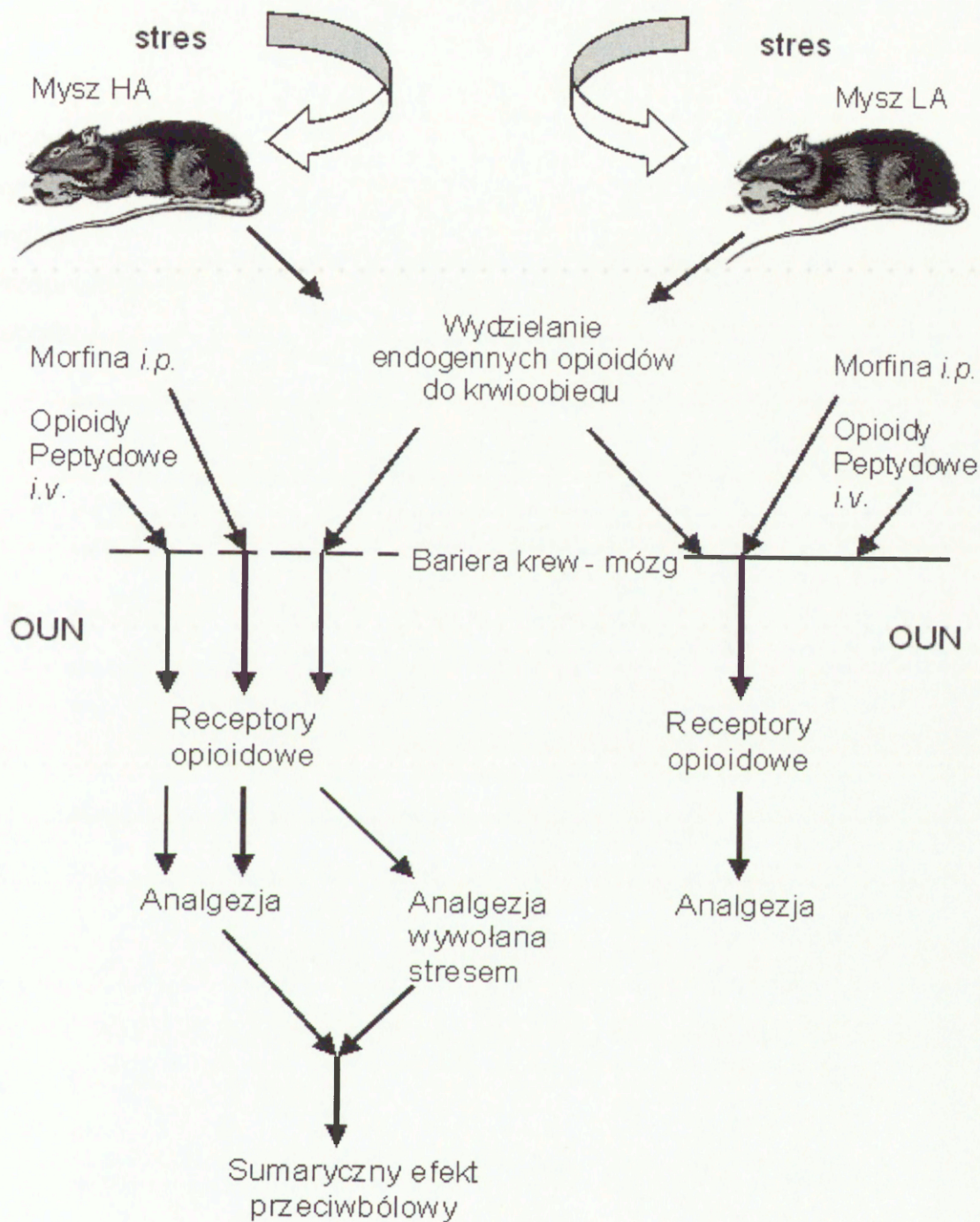
W przypadku myszy linii LA nie zaobserwowano istotnych zmian w budowie BBB, mogących wpływać na jej przepuszczalność. W porównaniu do myszy HA, u których pośród normalnych struktur obserwowano struktury zmienione patologicznie, BBB u myszy linii LA wydaje się mieć budowę prawidłową (Ryc.44, 45). Zaobserwowane patologiczne zmiany w morfologii BBB u myszy HA przypominają zmiany towarzyszące wielu chorobom neurodegeneracyjnym takim jak stwardnienie rozsiane czy choroba

Alzheimera. Wszelkie zmiany patologiczne towarzyszące tym jednostkom chorobowym poprzedzane są zmianami w funkcjonowaniu BBB związanymi z przerwaniem ścisłych połączeń między komórkami śródbłonka tworzącymi BBB (Huber J.D. i wsp. 2001). Jednakże brak jakichkolwiek objawów świadczących o procesie chorobotwórczym u myszy HA świadczy o tym, że zmiany patologiczne w budowie BBB nie wpływają na jakość życia tych zwierząt. Wielopokoleniowa selekcja zwierząt w kierunku analgezji wywołanej stresem doprowadziła u myszy HA do zmian w budowie śródbłonka, tworzącego BBB, a tym samym do zwiększenia jej przepuszczalności. Zaburzona budowa BBB u myszy HA, umożliwia uwalnianym w stresie do krwi obwodowej endogennym opioidom (endorfiny, enkefaliny), przenikanie do OUN i wywoływanie silnej analgezji. W warunkach silnego stresu myszy linii LA, w przeciwieństwie do myszy HA nie wykazują wysokiej analgezji, a budowa ich BBB nie wykazuje struktur zmienionych patologicznie.

Dlatego też, proponowanym mechanizmem warunkującym zwiększenie aktywności przeciwbólowej obwodowo podawanych peptydów opioidowych u myszy HA poddanych działaniu czynnika stresowego, są interakcje jakie zachodzą pomiędzy egzogennie podawanymi związkami a opioidami endogennymi, uwalnianymi podczas stresu. Rozszczelnienie BBB u tych zwierząt umożliwia opioidom, zarówno egzogennym jak i endogennym przechodzenie do OUN, a następnie działając poprzez receptory opioidowe wykazać sumaryczny efekt przeciwbólowy, potęgując tym samym efekt analgetyczny. U zwierząt linii LA, szczelna BBB ogranicza dostęp do OUN i uniemożliwia wystąpienie efektu sumarycznego (Ryc.48).

Przeprowadzone badania umożliwiły opisanie mechanizmów warunkujących zróżnicowaną analgezję poststresową u selekcjonowanych linii myszy. Zwierzęta te mogą w przyszłości okazać się nieocenionym modelem indywidualnej wrażliwości na stres czy ból u ludzi. Selekcjonowane linie myszy różnie odpowiadają na związki o charakterze przeciwbólowym, a stres nasila lub osłabia ich działanie. Zastosowanie tego modelu zwierzęcego w

badaniach farmakologicznych, pozwoli na przewidzenie efektu analgetycznego badanych leków u ludzi z różną wrażliwością bólową czy też w stresie. Zaobserwowane zmiany patologiczne w strukturze BBB u linii HA sprawiają, że zwierzęta te mogą znaleźć zastosowanie jako model degeneracji BBB.



Ryc. 48. Różny efekt działania peptydów opioidowych i alkaloidu opiatowego-morfiny u myszy HA i LA.

## 14. Wnioski

Hipoteza leżąca u podstaw podjętych badań zakładała, że różnice w odpowiedzi antynocyceptywnej na stres pływania u dwóch linii myszy HA i LA wynikają głównie z różnej przepuszczalności bariery krew- mózg dla endogennych opioidów uwalnianych do krwioobiegu w czasie stresu. Przeprowadzone doświadczenia zmierzały do potwierdzenia lub zaprzeczenia wstępnej hipotezie.

1. Przeprowadzono badania w mikroskopie elektronowym preparatów mózgow myszy linii HA, LA i grupy kontrolnej. Wykazano istnienie nasilonych zmian patologicznych u linii HA, które mogą powodować obniżenie szczelności bariery krew- mózg.
2. Przeprowadzono badania akumulacji w mózgu myszy, dokrewnie podawanego peptydu opioidowego zawierającego znacznik fluorescencyjny. Zaobserwowano zwiększenie akumulacji związku u zwierząt linii HA wykazującej zwiększoną odpowiedź antynocyceptywną.
3. Podawany dożylnie peptyd opioidowy o słabej zdolności przechodzenia przez barierę krew- mózg u zwierząt linii HA powoduje synergiczne wzmocnienie postresowej analgezji. U zwierząt linii LA nie obserwowano wzmacniającego wpływu peptydu.
4. Wykazano duże różnice w odpowiedzi antynocyceptywnej na peptyd opioidowy podawany dożylnie. U zwierząt HA peptyd opioidowy wykazywał znacznie większy efekt antynocyceptywny.
5. Nie obserwowano istotnych różnic u zwierząt linii HA i LA w efekcie antynocyceptywnym dożylnie podawanej morfiny (związku o dużej zdolności przejścia bariery krew- mózg).
6. Prozapalny czynnik stresujący, powodujący neurofizjologiczne efekty postresowe oraz zwiększenie przepuszczalności bariery krew- mózg, powoduje zrównanie w odpowiedzi zwierząt linii HA i LA na działanie dożylnie podawanego peptydu opioidowego.



Przedstawione wnioski z przeprowadzonych doświadczeń w pełni potwierdzają hipotezę pracy, że dwie linie myszy HA i LA wykazują różną przepuszczalność bariery krew- mózg.

## 15. Streszczenie

Ból jest niezbędnym elementem funkcjonowania organizmu. Rozwój inżynierii genetycznej a także zastosowanie odpowiednich metod hodowli zwierząt laboratoryjnych przyczyniły się do stworzenia modeli zwierzęcych o różnej wrażliwości na ból, wykazując, że wrażliwość na ból jest uwarunkowana genetycznie.

Zapoczątkowana przez prof. B. Sadowskiego z Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt w Jastrzębcu, selekcja myszy Swiss Webster doprowadziła do wyodrębnienia dwóch linii zwierząt: HA (high analgesia- linia wysokoanalgetyczna) i LA (low analgesia- linia niskoanalgetyczna). Linie te różnią się istotnie pod względem reakcji bólowych jak też wrażliwości na analgetyczne działanie leków i stresorów środowiskowych.

Sadowski i współpracownicy poszukiwali biochemicznych przyczyn różnic w odpowiedzi na stres u dwóch linii myszy (HA i LA). Główne kierunki poszukiwań koncentrowały się na możliwych różnicach w ekspresji endogennych neuromodulatorów lub/i ich receptorów. Jednakże wieloletnie badania nie wykazały różnic mogących tłumaczyć duże różnice w odpowiedzi na stres. Nasz zespół postawił hipotezę, że różnice pomiędzy liniami HA i LA są wynikiem różnic w przepuszczalności bariery krew- mózg dla endogennych peptydów (enkefalin, endorfin) wydzielanych do krwioobiegu w czasie stresu.

Większość egzogennie podawanych peptydów opioidowych do krwioobiegu zdrowych ludzi i zwierząt, wykazuje bardzo ograniczony stopień przechodzenia przez barierę krew- mózg. Celem podjętych badań w ramach pracy doktorskiej była analiza analgetycznego działania opioidowych analogów peptydowych u linii HA i LA. Założono, że uzyskane dane dostarczą argumentów wspomagających lub zaprzeczających postawionej

hipotezie o roli bariery krew- mózg w różnej odpowiedzi na stres u linii HA i LA.

Przeprowadzone badania własne potwierdziły, że myszy linii HA i LA wykazują różnice pod względem poziomu analgezji wywołanej stresem. Obserwacja różnic w hamowaniu odruchów bólowych u selekcionowanych zwierząt, po obwodowym podaniu związku opioidowego pozwalałaby na wykazanie różnic w przepuszczalności BBB dla danego związku. W celu określenia tych różnic pomiędzy selekcionowanymi liniami myszy zastosowano związki opioidowe- peptydowe i niepeptydowe w różnym stopniu przechodzące do OUN po podaniu obwodowym.

Przeprowadzone badania nie wykazały istotnych różnic pomiędzy selekcionowanymi liniami myszy w poziomie analgezji wywołanej dootrzewnowym podaniem morfiny, natomiast poszczególne linie zwierząt całkiem inaczej zareagowały na podanie peptydu częściowo przechodzącego przez BBB jakim jest bifalina i jej analog AA2016. Uzyskane wyniki wykazały, że bifalina oraz jej analog AA2016 wykazują działanie zarówno u myszy linii HA jak i LA, jednakże efekt u linii HA jest znacznie silniejszy. W związku z tym, że bifalina jak i jej analog, dzięki opracowanej strukturze są związkami częściowo przechodzącymi przez BBB, fakt, że wywołują analgezję u obu linii myszy nie powinien dziwić. Jednak porównując poziom uzyskanej analgezji u selekcionowanych linii myszy wydaje się, że bifalina w większym stopniu przenika po podaniu dożylnym do OUN u myszy HA, co może wskazywać na możliwe zwiększenie przepuszczalności BBB dla tego związku u tej linii zwierząt. W przypadku zastosowania peptydu opioidowego endomorfiny-1 (EM-1), praktycznie nie przechodzącego przez barierę krew mózg, efekt analgetyczny obserwowano tylko u myszy HA, co świadczy o zwiększonej przepuszczalności BBB u tej linii myszy dla tego peptydu.

W związku z tym, że myszy selekcionowane pod kątem wysokiej i niskiej analgezji postresowej różnią się istotnie poziomem analgezji po zastosowaniu bodźca stresowego w postaci wymuszonego pływania,

postanowiono poddać ocenie wpływ stresu na efekt analgetyczny podawanych obwodowo opioidów.

Zastosowanie różnych stresorów w postaci wymuszonego pływania lub też dootrzewnowego podania roztworu formaliny umożliwiło obserwację zmian w aktywności podawanych obwodowo opioidów. U zwierząt wykazujących wysoką analgezję postresową zastosowanie stresora potęgowało efekt analgetyczny podawanego egzogennie związku, prawdopodobnie w wyniku synergicznego współdziałania endogennych i egzogennych opioidów.

Dootrzewnowe podanie formaliny zastosowane jako rodzaj stresora wpłynęło znacznie na efekt analgetyczny bialiny. U linii HA, bialina wykazała znacznie wyższe wartości niż bialina u zwierząt niestresowanych. Efekt ten był podobny do efektu wywołanego stresem pływania. Jednakże zaobserwowano różnice w odpowiedzi linii LA. Stresor, wywołujący jednocześnie stan zapalny, zwiększał efekt analgetyczny bialiny u zwierząt linii LA i K. Należy jednak zaznaczyć, że u linii HA wzrost poziomu analgezji był widoczny już w pierwszych przedziałach czasowych, to u linii LA i K narastający efekt analgetyczny widoczny był dopiero od 15- 30 min. po podaniu związku. Świadczy to o tym, że wzrost efektu analgetycznego bialiny obserwowano dopiero w drugiej fazie działania formaliny, związanej z rozwojem stanu zapalnego. Wykazano, że uwalniane podczas rozwoju stanu zapalnego, czynniki prozapalne wpływają na integralność BBB, prowadząc do zwiększenia jej przepuszczalności. Wyniki te potwierdziły więc, że różna reakcja selekcyonowanych linii myszy na działanie stresora czy też związków opioidowych jest wynikiem różnic w przepuszczalności BBB.

Potwierdzają to także badania, mające na celu określenie zawartości podawanego obwodowo peptydu opioidowego w mózгах myszy selekcyonowanych w kierunku wysokiej i niskiej analgezji postresowej. Podanie zwierzętom związku ze znacznikiem fluorescencyjnym umożliwiło identyfikację tego peptydu w mózgu myszy przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Otrzymane wyniki wykazały różnice w

ilości zidentyfikowanego peptydu pomiędzy linią HA i LA. W związku z tym, że zastosowany peptyd charakteryzuje się częściowym przechodzeniem przez BBB, zidentyfikowano go zarówno w mózgu myszy linii HA jak i LA, jednakże jego ilość była różna. Wysokie wartości MPE uzyskane u linii HA po podaniu peptydu ze znacznikiem fluorescencyjnym są ściśle skorelowane z większą zawartością tego peptydu w mózgach tych zwierząt. Natomiast niższe wartości MPE uzyskane u linii LA po podaniu tego samego związku są skorelowane z niższą zawartością peptydu w mózgach myszy selekcjonowanych w kierunku niskiej analgezji. Wyniki te poświadczają wcześniej postawioną hipotezę o różnicach w przepuszczalności BBB u selekcjonowanych myszy.

Uzyskane wyniki były przesłanką do przeprowadzenia badań mikroskopowych BBB mających na celu w pełni potwierdzić na wstępie postawioną hipotezę. Badania te wykazały istnienie zmian patologicznych w budowie morfologicznej BBB u myszy HA, takie jak brak ścisłych połączeń międzykomórkowych a także obecność obrzęku okołonaczyniowego.

Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy potwierdziły postawioną na wstępie hipotezę dotyczącą różnic w przepuszczalności BBB pomiędzy selekcjonowanymi liniami myszy jako główną przyczynę w różnej reakcji na stres pływania. Proponowanym mechanizmem warunkującym zwiększenie aktywności przeciwbólowej obwodowo podawanych peptydów opioidowych u myszy HA są interakcje jakie zachodzą pomiędzy egzogennie podawanymi związkami a opioidami endogennymi, uwalnianymi podczas stresu. Rozszczelnienie BBB u tych zwierząt umożliwia opioidom, zarówno egzogennym jak i endogennym przenikanie do OUN, a następnie działając poprzez receptory opioidowe wykazać efekt addytywny, potęgując efekt analgetyczny. U zwierząt linii LA, szczelna BBB ogranicza dostęp do OUN, a tym samym uniemożliwia wystąpienie efektu addytywnego. Nie znane są przyczyny patologii bariery- krew mózg w linii HA. Odpowiedź na to pytanie może być kluczem do wielu problemów neurofizjologicznych obserwowanych u człowieka.

Zaobserwowane zmiany patologiczne w strukturze BBB u linii HA sprawiają, że zwierzęta te mogą znaleźć zastosowanie jako model degeneracji BBB. Model zwierzęcy HA/LA może w przyszłości okazać się nieocenionym modelem badania indywidualnej odpowiedzi ośrodkowego układu nerwowego na czynniki występujące obwodowo.



## 16. Piśmiennictwo

Abbruscato T.J., Williams S.A., Misicka A., Lipkowski A.W., Hruby V.J., Davis T.P. „Blood-to-central nervous system entry and stability of biphalin, a unique double-enkephalin analog, and its halogenated derivatives”. *J Pharmacol Exp Ther.* 276: 1049-1057, 1996

Abbruscato T.J., Davis T.P. „Protein expression of brain endothelial cell E-cadherin after hypoxia/ aglycemia: influence of astrocyte contact” *Brain Res.* 842: 277- 286, 1999

Aloisi A.M., Albonetti M.E., Muscettola M. Facchinetti F., Tanganelii C., Carli G. „Effects of formalin-induced pain on ACTH, beta-endorphin, corticosterone and Interleukin-6 plasma levels in rats”. *Neuroendocrinology.* 62: 13- 18, 1995

Antkowiak B., Kowalczyk M. „Rola układu noradrenergicznego w antynocycepcji” *Neur Neurochir Pol.* 3: 81-95, 1998

Antkowiak B., Kowalczyk M. „Zstępujące mechanizmy układu antynocyceptywnego” *Symposium „Postępy w leczeniu bólu” Ryto, 24-26.09.1998*

Bach F.W., Yaksh T.L. „Release of beta-endorphin immunoreactivity from brain by activation of hypothalamic N-methyl-D-aspartate receptor” *Neuroscience.* 65: 775- 783, 1995

Balda M.S., Flores- Maldonado, Cereijido M., Matter K. „Multiple domains of occluding are involved in the regulation of paracellular permeability” *J Cell Biochem.* 78: 85- 96, 2000

Ballabh P., Braun A., Nedergaard M. „The blood- brain barrier: an overview. Structure, regulation, and clinical implications.” *Neurobiol Dis.* 16: 1- 13, 2004

Bartolomucci A., Palanza P., Sacerdote P., Ceresini G. „Individual housing induces altered immunoendocrine responses to psychological stress in male mice” *Psychoneuroendocrinology*. 28: 540–558, 2003

Baszczyńska B. „Molekularne podstawy zaburzeń psychicznych wywołanych stresem” *Postępy Hig Med Dośw.* 61: 690-701, 2007

Belova T.I., Jonsson G. „Blood- brain barrier permeability and immobilization stress” *Acta Physio Scand.* 116: 21- 29, 1982

Berkley K.J. „Sex differences in pain” *Behav Brain Sci.* 20: 371- 380, 1997

Berzin T.M. „Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease” *Neurobiol Aging.* 21: 349- 355, 2000

Błaszczuk J.W., Tajchert K., Łapo J., Sadowski B. „Acoustic startle open- field behavior in mice bred for magnitude of swim analgesia” *Physiol Behav.* 70: 471- 476, 2000

Bodnar R.J., Kelly D.D., Brutus M., Glusman M. „Stress- induced analgesia: neural and hormonal determinants” *Neurosci Biobehav Rev.* 4: 87- 100, 1979

Bolton S.J., Anthony D.C., Perry V.H. „Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo”. *Neuroscience.* 86: 1245-1257, 1998

Brookoff D. „Przewlekły ból: nowa choroba?” *Medycyna po dyplomie* 10: 185- 194, 2001

Bujdoso E., Jaszberenyi M., Tomboly C., Toth G., Teiegdy G. „Behavioral and neuroendocrine action of endomorphin-2” *Peptides.* 22: 1459-1463, 2001

Campbell J.N., Raja S.N., Cohen R.H., Manning D.C., Khan A.D., Meyer R.A. „Peripheral neural mechanisms of nociception” w Wall P.D., Melzack R. „Textbook of pain”, Edinburgh, Churchill, 10- 124, 1989



Carr D.B., Bullen B.A., Skrinar G.S., Arnoid M.A., Rosenblatt M., Beitins I.Z., Martin J.B., McArthur J.W. „Physical conditioning facilitates the exercise-induced secretion of  $\beta$ -endorphin and  $\beta$ -lipotropin in women” *New Eng J Med.* 305: 560-562, 1981

Carr D.B., Goudas L.C. „Acute pain” *Lancet.* 353: 2051-2058, 1999

Carr D.B., Lipkowski A.W. „Neuropeptides and pain” *Agressologie.* 31: 173-177, 1990

Carr D.B., Lipkowski A.W., Siibert B.S. “Biochemistry of the opioid peptide” w Estafanous F.G. “Opioids in anesthesia II” Butterworth- Heinemann, 3- 16, 1984

Carrasco G.A., Van de Kar „Neuroendocrine pharmacology of stress” *Eur J Pharmacol.* 463: 235-272, 2003

Carruba M. O., Nisoli E., Garosi V., Sacerdote P., Panerai A. E., Da Prada M. „Catecholamine and serotonin depletion from rat spinal cord: effects on morphine and footshock induced analgesia” *Pharmacol Res.* 25: 187- 193, 1992

Cepeda M.S., Bonney I., Moyano J., Carr D.B. „Corticotropin-releasing hormone (CRH) produces analgesia in a thermal injury model independent of its effect on systemic beta-endorphin and corticosterone” *Regul Pept.* 118: 39– 43, 2004

Charmandari E., Tsigos C., Chrousos G. „Endocrinology of the stress response” *Annu Rev Physiol.* 67: 259-84, 2005

Chrousos G.P., Gold P.W. „The concepts of stress and stress system disorders” *J Am Med Assoc.* 267: 1244-1252, 1992

Cooper K., Carmody J. „The characteristics of the opioid- related analgesia induced by the stress of swimming in the mouse” *Neurosci Lett.* 31: 165-170, 1982

Cooper S.J. „Naloxone: effects on food and water consumption in non deprived and deprived rat” *Psychopharmacology*. 71: 1-6, 1980

Coventry T.L., Jessop D.S., Finn D.P., Crabb M.D., Kinoshita H. „Endomorphins and activation of the hypothalamo- pituitary- adrena axis” *J Endocrinol*. 169: 185- 193, 2001

Csullog E., Joo G., Toth G., Dobos I., Benedek G., Horvath G. „Antinociceptive effect of continuous intratheca administration of endomorphin- 1” *Pain*. 94: 31- 38, 2001

Czapla M.A., Goza D., Alea O.A., Beckerman R.C., Zadina J.E. „Differential cardiorespiratory effects of endomorphin- 1, endomorphin- 2 , DAMGO, and morphine” *Am J Respir Crit Care Med*. 162: 994- 999, 2000

Danysz A., Kleinrok Z. red. „Farmakologia. Podręcznik dla studentów medycyny” wydanie II zmienione i uzupełnione, PZWL, Warszawa 1987

Danysz A., Kleinrok Z. red. „Podstawy farmakologii dla lekarzy, farmaceutów i studentów medycyny” Volumed, 1996

De Lange E.C.M., Hasselink M.B., Danhof M., de Boer A.G., Breimer D.D. „The use of intracerebrai microdialisis to determine changes in blood- brain barrier transport characteristics” *Pharmaceut Res*. 12: 129- 133, 1995

Dickenson A.H. „Spinal cord pharmacology of pain” *Br J Anaesth*. 75: 193- 200, 1995

Dobrogowski J., Wordliczek J. „Medycyna bólu” PZWL, Warszawa 2004

Dray A., Urban L., Dickenson A. H. „Pharmacology of chronic pain” *Trends Pharmacol. Sci*. 15: 190- 197, 1994

Dunn A., Berridge C.W. „Psychological and behaviorai responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety and stress responses” *Brain Res Rev*. 15: 71-74, 1990

Egleton R.D., Davis T.P. „Bioavailability and transport of peptides and peptide drugs into the brain”. *Peptides*. 18: 1431-1439, 1997

Egleton R.D., Davis T.P. „Development of neuropeptide drugs that cross the blood- brain barrier” *NeuroRx*. 2: 44- 53, 2005

Esposito, P., Gheorghe, D., Kandere, K., Pang, X., Connoly, R., Jacobson, S.,Theoharides, T.C. „Acute stress increases permeability of the blood-brain barrier through activation of brain mast cells”. *Brain Res*. 888: 117–127, 2001.

Faraday M.M. „Rat sex and strain differences in responses to stress” *Physiol Behav*. 75: 507– 522, 2002

Fields H.L., Vanegas H., Hental I.D., Zorman G. „Evidence that disinhibition of brain stem neurons contributes to morphine analgesia” *Nature*. 306: 684-686, 1983

Funahashi A. „Pain and stress: Theoretical perspectives of interaction with immune and endocrine systems” *Bulletin of the Faculty of Education. The department of Educational Psychology* 31: 43-50, 1984

Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S. „Claudin- 1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions” *J Cell Biol*. 141: 1539- 1550, 1998

Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yenomura S., Tsukita S. „Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions” *J Cell Biol* 123: 1777- 1788, 1993

Furuse M., Sasaki H., Fujimoto K., Tsukita S. „A single gene product, claudin- 1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts” *J Cell Biol*. 143: 391- 401, 1998

Gaudriault G., Nouel D., Farra C.D., Beaudet A., Vincent J.P. „Receptor-induced internalization of selective peptide mu and delta opioid ligands” *J Biol Chem*. 272: 2880- 2888, 1997

Grieb P., Forster R.E., Strome D., Goodwin C.W., Pape P.C. „O<sub>2</sub> exchange between blood and brain tissues studied with <sup>18</sup>O<sub>2</sub> indicator- dilution technique” J App Physiol. 58: 1929- 1941, 1985

Guzek J. „Układ dokrewny” w „Patofizjologia” pod red. Maśliński S., Ryzewski J., PZWL, 203-206, 1998

Hammond D.L., Yaksh T. L. „Antagonism of stimulation- produced antinociception by intratheca administration of methysergide or phentolamine” Brain Res. 298: 329- 337, 1984

Hanin I. „The Gulf War, stress and a leaky blood-brain barrier”. Nat Med. 2: 1307–1308, 1996

Hawranko A.A., Serafini M., Smith D.J. „Anti- analgesia and reduced antinociception from supraspinaly administered  $\beta$ i endorphin in stressed rats: dependence on spinal cholecystokinin via cholecystokinin B receptors” Neurosci Lett. 267: 101- 104, 1999b

Hawranko A.A., Smith D.J. „Stress reduces morphine’s antinociceptive potency: dependence upon spinal cholecystokinin processes” Brain Res. 824: 251-257, 1999a

Heinricher M.M., Morgan M.M. „Supraspinal mechanisms of opioid analgesia” w Stein Ch. „Opioids in pain control : basic and clinical aspects” Cambridge University Press USA. 46- 69, 1999

Heinricher M.M., Tortorici V. „Interference with GABA transmission in the rostral ventromedial medulla: Disinhibition of off- cells as a central mechanism in nociceptive modulation” Neurosci. 63: 533-546, 1994

Hilgier M. „Historia i leczenie bólu przewlekłego” Now Med. 110: 2-6, 1999

Hoisboer F. „Antidepressant drug discovery In the postgenomic era” World J Biol Psychiatry. 2: 165-177, 2001

Holsboer F. „The corticosteroid receptor hypothesis of depression”  
Neuropsychopharmacology. 23: 477-501, 2000

Holsboer F. „The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor  
antagonists to treat depression and anxiety” J Psychiatr Res. 33: 181- 214,  
1999

Horan P.J., Mattia A., Bilsky E.J. , Weber S. , Davis T.P., Yamamura H.I.,  
Malatynska E., Appleyard S.M. , Slaninova J., Misicka A. „Antinociceptive  
profile of biphalin, a dimeric enkephalin analog”. J Pharmacol Exp Ther. 265:  
1446-1454, 1993.

Horvath G. „Endomorphin- 1 and Endomorphin- 2: pharmacology of the  
selective endogenous mu- opioid receptor agonists.” Pharmacol Ther. 88:  
437- 463, 2000

Huber J.D. „Inflammatory pain alters blood- brain barrier permeability and  
tight junctional protein expression” Am J Physiol Heart Circ Physiol. 280:  
1241-1248, 2001

Huber J.D., Egejton R.D., Davis T.P. „Molecular physiology and  
pathophysiology of tight junctions in the blood- brain barrier” Trends  
Neurosci. 24: 719- 725, 2001

Jinning L., Chofflon M., Juillard, C., Donati Y., Mili N., Siegrist C.A., Grau G.E.  
„Brain microvascular endothelial cells and leukocytes derived from patients  
with multiple sclerosis exhibit increased adhesion capacity” Neuroreport. 8:  
629- 633, 1997

Johansson B.B., Li C.L., Olsson Y., Klatzo I. „The effect of acute arterial  
hypertension on the blood- brain barrier to protein tracers” Acta Neuropathol.  
16: 117- 124, 1970

Kamei J. Kasuya Y. „Effects of double-enkephalin (biphalin), an enkephalin  
analogue, on respiration and the cough reflex in rats”. J Pharmacobiodyn.  
11: 645-650, 1988

Kew D., Kiipatrick D. L. „Widespread organ expression of the rat proenkephalin gene during early postnatal development” *Mol Endocrinol.* 4: 337- 340, 1990

Kimelberg H.K., Rutledge E., Goderie S., Charniga C. „Astrocytic swelling due to hypotonic media or high K<sup>+</sup> causes inhibition of glutamate and aspartate uptake and increases their release” *J Cereb Blood Flow Metab.* 15: 409- 417, 1995

Kniese U., Wolburg H. „Tight junctions of the blood- brain barrier” *Cell Mol Neurobiol.* 20: 57- 76, 2000

Konecka A.M., Sroczyńska I., Lipkowski A.W. “The effect of enkephalin dimers on body temperature in mice”. *Peptides.* 8: 431-5, 1987

Kostowski W. „Współczesne kierunki badań nad patomechanizmem stresu i depresji i ich znaczenie w kształtowaniu poglądów na działanie leków przeciwdepresyjnych” *Psychiatria.* 2: 63- 71, 2004

Kostowski W. red. “Podstawy farmakoterapii. Podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy” wydanie II, PZWL, Warszawa, 1998, 2001

Krajnik M., Żylicz Z. „Mechanizmy działania przeciwbólowego opioidów” *Pol Med Paliatyw.* 2: 111-118, 2003

Kusuhara H., Sugiyama Y. „Efflux transport systems for drugs at the blood- brain barrier and blood- cerebrospinal fluid barrier. Part I” *Drug Discov Today.* 6: 150- 156, 2001

Lai C.H., Kuo K.H., Leo J.M. „Critical role of actin in modulating BBB permeability” *Brain Res Rev.* 50: 7- 13, 2005

Landowski J. „Zaburzenia depresyjne a mechanizmy stresu” *Psychiatria w praktyce ogólnolekarskiej* 2: 9- 13. Via Medica, 2002

Lariviere W.R., Melzack R. „The role of corticotropin- releasing factor in pain and analgesia” *Pain.* 84: 1 - 12, 2000

Levine J.D., Fields H.L., Basbaum A.I. „Peptides and the primary afferent nociceptor” J Neurosci. 13: 2273, 1993

Lewis V.A., Gebhart G.F. „Evaluation of the periaqueductal central gray (PAG) as a morphine- specific locus of action and examination of morphine – induced and stimulation- produced analgesia as coincident PAG loci” Brain Res. 124: 283-303, 1977

Lipkowski A.W., Konecka A.M., Sroczyńska I., Przewłocki R., Stala L. S.W. Tam S.W. „Bivalent opioid peptide analogues with reduced distances between pharmacophores”. Life Sci. 40: 2283-2288, 1987.

Lipkowski A.W., Misicka A., Davis P., Stropova D., Janders J., Lachwa M., Porreca F., Yamamura H.I., Hruby V.J. „Biological activity of fragments and analogues of the potent dimeric opioid peptide, biphalin”. Bioorg Med Chem Lett. 9: 2763- 2766, 1999

Lipkowski A.W., Misicka A., Hruby V.J., Carr. D.B.: „Opioid peptide analogues: reconsideration as a potentially new generation of analgesics”. Polish J Chem. 68: 907-912, 1994

Lipkowski A.W., Konecka A.M. and Sroczyńska I. „Double-enkephalins: synthesis, activity on guinea-pig ileum, and analgesic effect”. Peptides. 3: 697-700, 1982.

Lipkowski A.W., Konecka A.M., Sadowski B. „Double Enkephalins”. Pol J Pharmacol Pharm. 34: 69-71, 1982.

Lipkowski A.W., Misicka A. „Neuropeptydy w leczeniu bólu” Anest Inten Ter. 25: 45-48, 1993

Lipkowski A.W., Misicka A., Kosson D., Kosson P., Łachwa- From M., Brodzik- Bieńkowska A., Hruby V.J. „Biological properties of a new fluorescent biphalin fragment analogue” Life Sci. 70: 893- 897, 2002

Lo E.H., Singhal A.B., Torchilin V.P., Abbot N.J. „Drug delivery to damaged brain” Brain Res Rev. 38: 140- 148, 2001

Lou J., Chofflon M., Juillard C. „Donatunction proteins occiuding and zonua occiudens- 1 from cerebral vascular endotheiium during neutrophil- induced blood- brain barrier breakdown in vivo” *Neurosci.* 86: 1245- 1257, 1998

Lutfy K., Sadowski B., Marek P., Kwon Ik-Sung, Keana J.F., Weber E. „Differential sensitivity of mice bred for stress- induced anaigesia to morphine and ACEA-1011 in the formaiin test” *Pharmacol Biochem Behav.* 5: 495- 500, 1996

Łapo I.B., Konarzewski M., Sadowski B. „Effect of cold acclimation and repeated swimming on opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia In selectively bred mice” *Physiol Behav.* 78: 345- 250, 2003

Manning B., Mayer D.J. „The central nucieus of the amygdalia contributes to the production of morphine antinociception in the tail fiick test” *Pain.* 63: 141- 152, 1995

Marchut M. „Serotonina” Wydawnictwo Mogilany, 1989

Maszczyńska I. „Ośrodkowe, przeciwbólowe działanie peptydu AA501, hydrazyduN'-tyrozyio-D-aianyio-giicyio-fenyioaianyio,N"benzyioksykarbonylo-tryptofanu” rozprawa doktorska , |CMDiK PAN, 1999

Maszczyńska I., Lipkowski A.W., Carr D.B., Kream R.M. „Alternative forms of interaction of Substance P and opioids in nociceptive transmission” *Lett Peptide Sci.* 5: 395- 398, 1998

Maszczyńska I., Mikaszewska M., Kosson D., Carr D.B., Szyfeibein S.K., Lipkowski A.W. „Interaction btween morphine and opioid peptides after s.c. administration” *Regui Pept.* 1: 243- 244, 1994

Matter R.L., Carroll J.A., Dyer C.J. „Neuroendocrine responses to stress” w Moberg G.P., Mench J.A. editors „The Biology of Anima Stress” CAB International, 2000

Maunder R. „Mediators of stress effects in inflammatory bowel disease: Not the usual suspects” *J Psychosom Res.* 48: 569- 577, 2000



McLaughlin P. J. „Proenkephalin - derived opioids peptides” w „Handbook of Biologically Active Peptides” Elsevier, 1313- 1317, 2006

Melzac R. „From the gate to neuromatrix” Pain. 6: 121-126,1999

Melzack R., Wall P.D. „Pain mechanisms: a new theory” Science. 150: 971-979, 1965

Millan M.J. „Descending control of pain” Prog Neurobiol. 66: 355- 474, 2001

Millan M.J., Gramsch C., Przewłocki R., Holtt V., Herz A. „Lesions of hypothalamic arcuate nucleus produce a temporary hyperalgesia and attenuate stress- evoked analgesia” Life Sci. 27: 1513- 1523, 1980

Minagar A., Shapshak P., Fujimura R., Ownby R., Heyes M., Eisdorfer C. „The role of macrophage/ microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurological disorders: HIV- associated dementia, Alzheimer disease and multiple sclerosis” J Neurol Sci. 202: 13- 23, 2002

Minami M., Satoh M. „Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions” Neurosci Res. 23: 121- 145, 1995

Misicka A., Lipkowski A.W., Horvath R., Davis P., Porreca F., Yamamura H.I., Hruby V.J.” Structure-activity relationship of biphalin. The synthesis and biological activities of new analogues with modifications in positions 3 and 4”. Life Sci. 60: 1263-9, 1997.

Misicka A., Lipkowski A.W. „Ligandy receptorów opioidowych” Neur Neurochir Pol. 3, 1998

Misterec K., Maszczyńska I., Dorociak A., Gumulka S.W., Carr D.B., Szyfelbein S.K., Lipkowski A.W. „Spinal co-administration of peptide substance P antagonist increases antinociceptive effect of the opioid peptide biphalin”. Life Sci. 54: 939-944, 1994.

Mizoguchi H., Narita M., Oji D.E., Suganuma C., Nagase H., Sora I. „The mu-opioid receptor gene- dose dependent reduction in G- protein activation in the pons/ medulla and antinociception induced by endomorphins in mu-opioid receptor knockout mice” *Neurosci.* 94: 203- 207, 1999

Mizoguchi H., Wu H-E., Narita M. „Partial agonistic action of endomorphins in the mouse spinal cord” *Neurosci Lett.* 310: 66- 68, 2001

Mogi J.S. „The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition” *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 7744- 7751, 1999

Mogi J.S., Sternberg W.F., Balian H., Liebeskind J.C., Sadowski B. „Opioid and nonopioid swim stress- induced analgesia: a parametric analysis in mice” *Physiol Behav.* 59: 123- 132, 1996

Mogi J.S., Sternberg W.F., Marek P., Sadowski M., Belknap K.K., Liebeskind J.C. „The genetics of pain and pain inhibition” *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 3048- 3055, 1996

Narita M., Mizoguchi H., Kampine J.P., Tseng L.F. „The effect of pretreatment with delta<sub>2</sub>- opioid receptor antisense oligodeoxynucleotide on the recovery from acute antinociceptive tolerance to delta<sub>2</sub>- opioid receptor agonist in the mouse spinal cord” *Br J Pharmacol.* 120: 587- 592, 1997

Nielsen C.S., Staud R., Price D.D. „Individual differences in pain sensitivity: Measurement, causation and consequences” *J Pain.* 10: 231- 237, 2009

Osawa T., Nakao T., Moriyoshi M., Nakada K. „Plasma  $\beta$ -endorphin around parturition and its relationship to cortisol level and resumption of pituitary and ovaria functions in dairy cows” *Anim Reprod Sci.* 52: 27- 38, 1998

Ossipov M.H., Lopez Y., Nichols M.L., Bian D., Porreca F. „The loss of antinociceptive efficacy of spinal morphine in rats with nerve ligation injury is prevented by reducing spinal afferent drive” *Neurosci Lett.* 199: 39- 48, 1999

Owens M.J., Nemeroff C.B. „Physiology and pharmacology of corticotrophin-releasing factor” *Pharmacol Rev.* 43: 425- 473, 1991

Oztaş B. , Akgül S., Arslan F.B. „Influence of surgical pain stress on the blood-brain barrier permeability in rats” *Life Sci.* 74: 1973–1979, 2004

Oztaş B., Kucuk M., Sandalci U. „Effect of insulin- induced hypoglycemia on blood- brain barrier permeability” *Exp Neurol.* 87: 129- 136, 1985

Panocka I., Marek M., Sadowski B. „Differentiation of neurochemical basis of stress-induced analgesia in mice by selective breeding” *Brain Res.* 397: 156- 160, 1986a

Panocka I., Marek P., Sadowski B. „Inheritance of stress- induced analgesia in mice. Selective breeding study” *Brain Res.* 397: 152- 155, 1986b

Paulson O.B. „Blood- brain barrier, brain metabolism and cerebral blood flow” *Eur Neuropsychopharmacol.* 12: 495- 501, 2002

Pertovaara A., Almeida A. „Descending inhibitory system” w Cervero F., Jensen T.S. Editors „Handbook of Clinical neurology” 81: 179-192, 2006

Peter A., Toth G., Tomboly C., Laus G., Turwe D. „Liquid chromatographic study of the enzymatic degradation of endomorphins, with identification by electrospray ionization mass spectrometry” *J Chromatogr.* 846 : 39- 48, 1999

Przekłasa- Muszyńska A. , Dobrogowski J., Wordliczek J. „Patofizjologia bólu ostrego” *Terapia* 11: 6-10, 2006

Przewłocki R., Przewłocka B. „ Opioids In chronic pain” *Eur J Pharmacol.* 429: 79- 91, 2001

Przewłocki R., Przewłocka B. „Neuronalne i molekularne podstawy uzależnienia od opiatów” *Alkoholizm i Narkomania* 14, 2001

Rascher G., Woiburg H. „The tight junctions of the leptomeningeal blood-cerebrospinal fluid barrier during development” J Brain Res. 38: 525- 540, 1997

Roger D. „Stress, health and personality: a new perspective” Complement Ther Nurs Midwifery. 4: 50-53, 1998

Sadowski B. „Biologiczne mechanizmy zachowania się ludzi i zwierząt” PWN 2006

Sadowski B., Konarzewski M. „Analgesia in selectively bred mice exposed to cold in helium/oxygen atmosphere” Physiol Behav. 66: 145- 151, 1999

Sakurada S., Sakurada T. „Endomorphins as endogenous peptides for mu-opioid receptor: their differences in the pharmacological and physiological characters” w „Handbook of biologically active peptides”, Elsevier, 2006

Saunders N.R., Ek C.J., Habgood M.D., Dziegielewska K.M. „Barriers in the brain: a renaissance?” Trends Neurosci. 31: 279- 286, 2008

Scherrmann J.M. „Drug delivery to brain via the blood- brain barrier” Vascul Pharmacol. 38: 349- 354, 2002

Schulman D., Kaufman J., Eisenstein M., Rapoport S „Blood pH and brain uptake of <sup>14</sup>C-morphine” Anesthesiology. 61: 540-543, 1984.

Sharma H.S., Nyberg F., Cervos- Navarro J., Dey P.K. „Histamine modulates heat stress- induced changes in blood- brain barrier permeability, cerebral blood flow, brain oedema and serotonin levels. An experimental study in conscious young rats” Neurosci. 50: 445- 454, 1992

Sharma, H.S., Dey, P.K., „Influence of long term immobilization stress on regional blood-brain barrier permeability, cerebral blood flow and 5-HT levels in conscious normotensive young rats”. J Neuro Sci. 72: 61–76, 1986.

Sheps D., Baiienger M.N., De Gent G.E., Krittayaphong R., Dittman E., Maixner W., McCartney W., Goider R.N., Koch G., Light K.C. „Psychophysical responses to a speech stressor: correlation of plasma beta-endorphin levels at rest and after psychological stress with thermally measured pain threshold in patients with coronary artery disease” J Am Coll Cardiol. 25: 1499-1503, 1995

Siibert B.S., Lipkowski A.W., Carr D.B., Szyfelbein S.K., Osgood P.F. „Peptides as potential antinociceptive drugs”. Prog Clin Biol Res. 328: 485-488, 1990.

Siibert B.S., Lipkowski A.W., Cepeda M.S., Szyfelbein S.K., Osgood P.F., Carr D.B. „Analgesic activity of a novel bivalent opioid peptide compared to morphine via different routes of administration”. Agents Actions. 33: 382-387, 1991

Siibert B.S., Lipkowski A.W., Cepeda M.S., Szyfelbein S.K., Osgood P.F., Carr D.B. „Enhanced potency of receptor-selective opioids after acute burn injury”. Anesth Analg. 73: 427-433, 1991

Skuitetyova I., Tokarev D., Jezova D. „Stress-induced increase in blood-brain barrier permeability in control and monosodium glutamate-treated rats” Brain Res Bull. 45: 175-178, 1998

Smith A. P., Lee N.M. „Pharmacology of dynorphin” Ann Rev Pharmacol Toxicol. 28: 123-140, 1988

Smith M. E. „POMC Opioid Peptides” w „Handbook of Biologically Active Peptides” Elsevier, 1325-1330, 2006

Spampinato S. „Prodynorphin-derived opioid peptides” w „Handbook of biologically active peptides” Elsevier, 1319-1324, 2006

Stamford J.A. „Descending control of pain” Br J Anaesth. 75: 217-227, 1995

Stein C. „The control of pain peripheral tissue by opioids” N Engl J Med. 332: 1685-1690, 1995

Sternberg W.F. Ridgway C.G. „Effects of gestational stress and neonatal handling on pain, analgesia, and stress behavior of adult mice” *Physiol Behav* 78: 375- 383, 2003

Stępiński J., Zajączkowski I., Kazem-Bek D., Temeriusz A., Lipkowski A.W., Tam S.W. „Use of hydrophilic diamines for bridging of two opioid peptide pharmacophores”. *J Peptide Protein Res.* 38: 588-592, 1991

Strbian D., Durukan A., Pitkonen M., Marinkovic I., Tatlisumak E., Pedrono E., Abo- Ramadan U., Tatiisumak T. „The blood- brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia” *Neurosci.*153: 175- 181, 2008

Sun D. „Role of chemokines, neuronal projections, and the blood- brain barrier in the enhancement of cerebral EAE following focal brain damage” *J Neuropathol Exp Neurol.* 59: 1031- 1043, 2000

Świdorski T. „Udział komponentu opioidowego i nieopiodowego w analgezji postresowej u selekcyonowanych linii myszy.” *Rozprawa doktorska* 1998, IGZ PAN

Tatet G.E., Bernardini R. „Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression” *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27: 893- 903, 2003.

Terenius L. „Opioid peptides, pain and stress” w Joosse J., Buijs R.M., Tiiders F.J.H.(Eds) *Prog Brain Res.* 92: 375-383, 1992

Terman G.W., Lewis J.W., Liebeskind J.C. „Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia: lack of cross-tolerance between stressors” *Brain Res.* 260: 147-150, 1983

Terman G.W., Shavit Y., Lewis J.W., Cannon J. T., Liebeskind J.C. „intrinsic mechanisms of pain inhibition: Activation by stress” *Science.* 226: 1270-1277, 1984

Thierry A. M., Javoy F., Glowinski J., Kety S. S. „Effects of stress on metabolism of norepinephrine, dopamine and serotonin in the central nervous system of the rat” J Pharmacol Exper Ther. 1: 163- 171, 1968

Traczyk Z., Trzebski A. „Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej” PZWL, T. 1, 1989

Truesdell L.S., Bodnar R.J. „Reduction in cold water swim analgesia following hypothalamic paraventricular nucleus lesions” Physiol Behav. 39: 727-731, 1987

Tseng L.F. „Evidence for  $\epsilon$ - opioid receptor-mediated  $\beta$ - endorphin- induced analgesia” Trends Pharmacol Sci. 22: 623-630, 2001

Turcatti G., Zoffmann S., Lowe J.A., Drozda S.E., Chassaing G., Schwartz T.W., Chollet A. „Characterization of non- peptide antagonist and peptide agonist binding sites of the NK1 receptor with fluorescent ligands” J Biol Chem. 272: 21167- 21175, 1998

Verlooy T J., Reempts J.V. „The blood- brain barrier in trauma, stroke and edema” Internationa Congress Series. 1277: 227- 234, 2005

Wang Q. P., Nakai Y. „The dorsal raphe: important nucleus in pain modulation” Brain Res. 34: 575- 585, 1994

Watkins L.R., Mayer D.J. „Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control system” Science. 216: 1185-1192, 1982

Werka T. „Stres i ból” w „Mózg a zachowanie” red. Górska T., Grabowska A., Zagrodzka J., PWN, Warszawa 2000

Wideman C.H., Murphy H.M., McCarthy S.B. „Interaction between vasopressin and food restriction an stress- induced analgesia” Peptides. 17: 63-66, 1996

Wiebke Janson, Christoph Stein „Peripheral opioid analgesia” Pol Med Paliatyw. 3: 119–130, 2004

Witt K.A., Gillespie T.J., Huber J.D., Egleton R.D., Davis P.D. „Peptide drug modifications to enhance bioavailability and blood- brain barrier permeability” *Peptides*. 22: 2329- 2343, 2001

Wolburg H., Lippoldt A. „Tight junctions of the blood- brain barrier: deveiopment, composition and regulation” *Vascul Pharmacol*. 38: 323- 337, 2002

Wolkovitz O.M, Reus V. „Treatment of depression with antiglucoocoricosteroid drugs” *Psychosom Med*. 61: 698- 711,1999

Wolkovitz O.M., Epef E.S., Reus V. „Stress hormone- related psychopathology: pathophysiological and treatment implications” *World J Biol Psychiat*. 2: 115-143, 2001

Wolkovitz O.M., Reus V. „Neurotransmitters, neurosteroids and neurotrophins: New models of pathopsyhioogy and treatment of depression” *World J Biol Psychiat*. 4: 98-102, 2002.

Wordliczek J., Dobrogowski J. „Patomechanizmy bólu” *Terapia*.10:6-11, 2004

Wordliczek J., Kuś M. „Bó ostry w praktyce lekarskiej” w „Bó i jego leczenie” Dobrogowski J. i wsp., 146- 164, Warszawa PWN Springer Verlag 1996

Wozniak W. „Przebieg dróg bólowych” *Neur Neurochir Poi*. 3: 21-23, 1998

Yamada K., Nabeshima T. „Stress-induced behaviora responses and multiple opioid systems in the brain” *Behav Brain Res*. 67: 133-145, 1995

Zadina J.E., Hackier L., Ge L.J. Kastin A.J. „A potent and selective endogenous agonist for the mu- opiate receptor” *Nature*. 386: 499- 502, 1997

Załucki G. „Układ nerwowy i narządy zmysłów” w „Fizjologia zwierząt” 15-143, 1995



Zangen A., Herzberg U., Vogel Z., Yadid G. „Nociceptive stimulus induces release of endogenous beta-endorphin in the rat brain” *Neurosci.* 85: 659-669, 1998

Żylicz Z., Krajnik M. „Jak powstaje ból? Neurofizjologia bólu dla początkujących” *Po Med Paliatyw.* 2: 49- 56, 2003

