

POLSKA AKADEMIA NAUK
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego



Piotr Kosson

LS 304
H4292

**AKTYWNOŚĆ PRZECIWBÓLOWA ZWIĄZKÓW
WYKAZUJĄCYCH AGONISTYCZNE DZIAŁANIE
NA RECEPTORY OPIOIDOWE
I TACHYKININOWE**

Rozprawa doktorska

Pracę wykonano w Zakładzie Neuropeptydów

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

Warszawa, 2009

*Serdeczne podziękowania składam promotorowi niniejszej pracy Panu Profesorowi Andrzejowi W. Lipkowskiemu za wskazanie tematu, opiekę i zaufanie przy tworzeniu tej pracy, Koleżankom z Zakładu Neuropeptydów za pomoc przy realizacji pracy, cenne, wielokroć krytyczne, uwagi, Annie za pomoc przy realizacji części doświadczalnej.
Bez pomocy tych osób praca ta nie mogłaby powstać.*

Wykaz skrótów

Asp	-	kwasi asparaginowy
CGRP	-	peptyd zależny od genu kalcytoniny
Derm	-	dermorfina
DRG	-	zwoje korzeni grzbietowych (<i>dorsal root ganglion</i>)
δ	-	receptor opioidowy δ
EAA	-	aminokwasy pobudzające (<i>excitatory amino acids</i>)
EM-I	-	endomorfina-1
EM-II	-	endomorfina-2
GABA	-	kwasi γ -aminomasłowy
Glu	-	kwasi glutaminowy
<i>i.c.v.</i>	-	podanie dokomorowe (<i>intracerebroventricular</i>)
<i>i.t.</i>	-	podanie podpajęczynówkowe (<i>intrathecalis</i>)
<i>i.v.</i>	-	podanie dożylné (<i>intravenousus</i>)
MF	-	morfina
MPE	-	maksymalny możliwy efekt (<i>maximal possible effect</i>)
μ	-	receptor opioidowy μ
NMDA	-	jonotropowy receptor pobudzany przez kwasi N-metylo-D-asparaginowy
NKA	-	neurokinina A
NKB	-	neurokinina B
NK-1	-	receptor neurokininowy 1
NK-2	-	receptor neurokininowy 2
NK-3	-	receptor neurokininowy 3
NO	-	tlenek azotu
OUN	-	ośrodkowy układ nerwowy
PAG	-	substancja szara okołowodociągowa
PDYN	-	prodynorfina
PENK	-	proenkefalina
POMC	-	proopiomelanokortyna
PPT-A	-	gen preprotachykininowy
α -PPT	-	preprotachykinina α
β -PPT	-	preprotachykinina β
γ -PPT	-	preprotachykinina γ

- PUN - obwodowy układ nerwowy
- κ - receptor opioidowy κ
- SP - substancja P
- SP(7-11) - C-końcowy fragment substancji P
- WDR - neurony konwergencyjne rdzenia kręgowego (*wide dynamic range neurons*)

Spis treści

Wykaz skrótów	3
I CZĘŚĆ TEORETYCZNA	6
1. Fizjologia bólu.....	7
2. Ce pracy	29
II CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	30
1. Materiał i metody	31
1.1 Synteza związku hybrydowego	31
1.2 Badania doświadczalne	31
1.2.1 Badania <i>in vitro</i>	31
1.2.1.1 Izolacja błon komórkowych mózgu szczura	31
1.2.1.2 Badanie wiązania peptydu AWL3106 do receptorów μ i δ	32
1.2.2 Badania <i>in vivo</i>	33
1.2.2.1 Przygotowanie zwierząt do doświadczeń	35
1.2.2.2 Test cofania ogona	38
2. Wyniki badań	40
2.1 Wiązanie peptydu AWL3106 do receptorów opioidowych typu δ i μ	40
2.2. Działanie antynocyceptywne peptydu AWL3106 po podaniu podpajęczynówkowym (<i>i.t.</i>) w teście cofania ogona	41
2.3 Działanie antynocyceptywne peptydu AWL3106 po podaniu dożylnym (<i>i.v.</i>) w teście cofania ogona	55
III DYSKUSJA	60
IV PODSUMOWANIE WNIOSKI	71
V STRESZCZENIE.....	72
VI PIŚMIENNICTWO	75

I

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Fizjologia bólu

Ból towarzyszy człowiekowi przez całe życie jako niezbędny element systemu obronnego, sygnalizującego powstanie lub istnienie stanów patologicznych w organizmie. Jest zjawiskiem subiektywnym, zależnym od wieku, płci, stanów emocjonalnych, religii, rasy czy wykonywanej profesji. Będąc zjawiskiem subiektywnym zawsze wywołuje odczucia o charakterze negatywnym. W pewnych sytuacjach ból staje się zjawiskiem korzystnym. Informuje pacjenta i lekarza o niepokojących procesach zachodzących w organizmie. Właściwie zastosowana terapia nie tylko znosi zjawisko bólu, ale eliminuje główną przyczynę jego zaistnienia. Ból był przedmiotem zainteresowania człowieka od zarania ludzkości, natomiast naukowe podejście miało miejsce dopiero pod koniec XIX wieku, kiedy to angielski uczony Sherrington w pracy „*The integrative action of the nervous system*” zdefiniował pojęcie bodźca bólowego. Pomimo tego, że od czasów Sherringtona nastąpił intensywny rozwój wiedzy na ten temat, to do dnia dzisiejszego nie poznano wszystkich mechanizmów regulujących ten fenomen.

Według definicji zaakceptowanej przez Komitet Taksonomii Międzynarodowego Towarzystwa Badania Bólu, ból określono jako nieprzyjemne, zmysłowe i emocjonalne odczucie wywołane przez istniejące lub też potencjalnie zagrażające uszkodzenie tkanek/narządów, odczucie któremu towarzyszy autonomiczna, emocjonalna i behawioralna odpowiedź ustroju.

Tab. 1. Ból w zależności od miejsca powstawania (wg Wörza, 1992).

Ból			
Somatyczny		Trzewny	
Ból powierzchniowy		Ból głęboki	
Ból pierwotny	Ból wtórny		
Skóra		Tkanka łączna, kości, stawy, mięśnie	Trzewia

W 1989 roku Woolf zaproponował podział bólu ze względu na patofizjologię na ból pierwotny (fizjologiczny, ostry) i wtórny (patologiczny, przewlekły). Ból pierwotny pełni rolę odruchowo-obronną, jest najczęściej krótkotrwały i ograniczony do miejsca uszkodzenia, które łatwo zlokalizować. Ból wtórny pojawia się później, jest często trudny do umiejscowienia i wiąże się ze wzrostem wrażliwości układu czuciowego tzw. sensytyzacją. Powoduje to obniżenie progu bólowego, przedłużenie trwania bólu oraz wzrost odpowiedzi bólowej.

Proces nocycepcji obejmuje 4 etapy: transdukcję (przetworzenie), przewodzenie, modulację i percepcję (Rice i Justins, 1999). Na pierwszym etapie czynnik uszkodzający (chemiczny, termiczny, mechaniczny), zostaje przetworzony na impuls elektryczny. Informacje bólowe odbierane są przez nocyceptory, którymi są wolne zakończenia nerwowe na obwodzie podczas gdy ciało neuronu znajduje się w DRG lub zwojach nerwów czaszkowych. Czynnik uszkodzający tkanki powoduje uwolnienie mediatorów nocyceptywnych takich jak np: jony potasowe, serotonina, bradykinina, substancja P, histamina, cytokiny, NO, produkty przemiany kwasu arachidonowego, neurokinina A, a drogą antydromową z zakończeń włókien aferentnych uwalniane są SP, NKA, CGRP. Wszystkie te czynniki powodują zmiany pobudliwości czuciowych i sympatycznych zakończeń nerwowych, rozszerzenie naczyń krwionośnych, zwiększenie ich przepuszczalności oraz stymulację komórek zapalnych do wydzielenia kolejnych mediatorów. W konsekwencji dochodzi do pobudzenia nocyceptorów o wysokim progu pobudzenia prowadząc do obwodowej sensytyzacji. Obwodowej sensytyzacji towarzyszy obniżenie progu bólowego i wzrost odpowiedzi na stymulację (hiperalgezia) (Costigan i Woolf, 2000, Wordliczek i Dobrogowski, 2002).

Impulsy nocyceptywne przewodzone są dwoma rodzajami włókien czuciowych:

1. A δ - zmielinizowane włókna o średnicy 2-5 μ m przewodzące z szybkością 12-30 m/s. Nocyceptory tych włókien to receptory o wysokim progu pobudliwości wrażliwe na bodźce mechaniczne, termiczne. Przewodzą impulsy bólu określane przez pacjentów jako ból kłujący. Jest to ból łatwy do zlokalizowania.

2. C bezmielinowe włókna o średnicy 0,1- 1,2 μm przewodzące z szybkością 0,5-2 m/s. Przewodzą impulsy bólowe określane przez pacjentów jako ból rwący, szarpiący, pulsujący. Jest to rodzaj bólu, w którym trudno umiejscowić źródło pochodzenia (Rice i Justins, 1999).

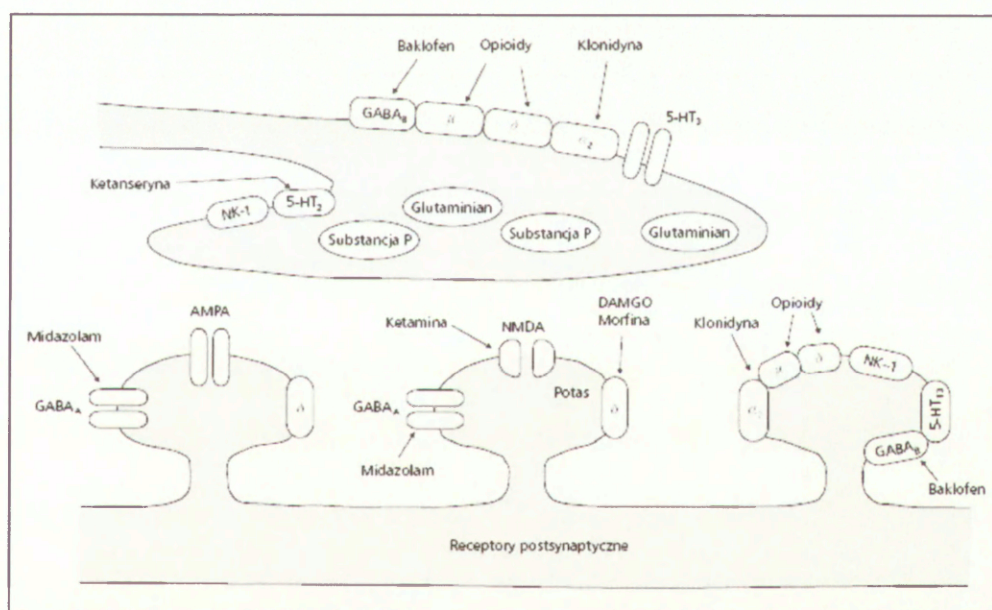
Pierwszorzędowe włókna aferentne wchodzi do rdzenia kręgowego korzeniami tylnymi tworząc dwa pęczki: boczny (najcieńsze, mielinowe włókna A δ oraz bezmielinowe C) i przyśrodkowy (głównie włókna A δ). Pęczek przyśrodkowy daje zakończenia głównie w warstwie II, wnikając do istoty szarej warstwy V przechodzi przez warstwę IV. W warstwie galaretowatej znajdują się ciała dużych neuronów, które są początkiem szlaków wstępujących oraz małe interneurony biorące udział w ujemnym sprzężeniu zwrotnym regulującym intensywność doznań bólowych. Do blaszki I dochodzą również dendryty dużych neuronów leżących w tzw. jądrze właściwym rdzenia (blaszka IV, V, VI). Grube włókna pęczka przyśrodkowego tworzą synapsy pobudzeniowe również z dendrytami neuronów jądra właściwego.

Włókna pęczka bocznego tworzą połączenia synaptyczne głównie w blaszce I. Komórki łączące się z cienkimi włóknami A δ i C w dużej części stanowią neurony szlaków wstępujących oraz interneuronów. Neurony leżące w poszczególnych warstwach mają połączenia z innymi neuronami leżącymi głębiej, dlatego też duża część neuronów przekazujących bodźce nocyceptywne do wyższych struktur OUN nie jest połączona z pierwszorzędownymi włóknami aferentnymi monosynaptycznie. Takie neurony klasyfikuje się jako neurony II lub III rzędu. Włókna bólowe mają bezpośrednie połączenia w obrębie warstw z trzema grupami neuronów rogów tylnych:

- projekcyjnymi – prowadzą bodźce do wyższych pięter OUN
- lokalnymi interneuronami pobudzającymi
- interneuronami hamującymi – pełnią funkcję regulacyjną w stosunku do impulsów bólowych docierających do ośrodka (Gumułka i Rewerski, 1989).

Zakończenia pierwotne obu rodzajów włókien kończą się w rogach tylnych rdzenia kręgowego. Włókna A δ w warstwie I, IV, V i VI, a włókna C w warstwie I i II tworząc połączenia synaptyczne z neuronami drugorzędownymi. Na tym poziomie odbywa się proces dywergencji informacji nocyceptywnej,

której efektem może być zahamowanie, nasilenie lub modulowanie uwalniania neuroprzebieżników (Ryc. 1). Głównymi neuroprzebieżnikami wydzielanymi z pierwszorzędowych neuronów czuciowych są SP, oraz aminokwasy pobudzające (AEEs) takie jak kwas asparaginowy i glutaminowy, neurokinina A i CGRP. Wynikiem oddziaływania neuroprzebieżników i receptorów zlokalizowanych zarówno pre- jak i post-synaptycznie obejmujących receptory neurokininowe, NMDA, opioidowe typu μ , δ , κ , receptory α adrenergiczne, GABA, serotoninowe (5-HT), adenyzynowe, impuls bólowy może zostać przesłany do wyższych piętér układu nerwowego lub ulec zahamowaniu (Costigan i Woolf, 2000).



Ryc. 1 Receptory pre- i postsynaptyczne w rogach tylnych rdzenia kręgowego. NMDA (N-metylo-D-asparate) - receptory N-metylo-D-asparaginowe; GAMA (gamma-aminobutyric acid) – kwas γ -aminomasłowy; NK-1 – receptor neurokininowy 1; DAMGO – selektywny agonista receptora opioidowego μ ; AMPA – receptory wiążące kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-osoksazolo-propionowy (Carr i Cousins, 1998).

Drogi bólowe wstępujące

Przekazywanie sygnału bólowego do ośrodkowego układu nerwowego odbywa się drogami wstępującymi:

-rdzeniowo-wzgórzowa boczna, której neurony dochodzą do wzgórza w sznurze przednim i bocznym rdzenia kręgowego. Drogą tą przewodzone są przede wszystkim informacje bólu powierzchniowego (nocycepcja powodowana bodźcem termicznym, elektrycznym, mechanicznym) (Rice i Justins, 1999).

-rdzeniowo-wzgórzowa przyśrodkowa składa się z włókien, których ciała leżą w warstwie VII i VIII istoty szarej rdzenia kręgowego. Droga ta kończy się w środkowej części wzgórza, moście, substancji szarej okołowodociągowej oraz podwzgórzu. Uważa się, że drogą tą przewodzone są informacje somatyczne i trzewne (Gumułka i Rewerski, 1989).

Istnieje jeszcze droga rdzeniowo-śródmózgowiowa i rdzeniowo-siatkowata przewodząca do tworu siatkowatego, do wzgórza, podwzgórza i substancji szarej okołowodociągowej (PAG). Jest ona odpowiedzialna za przewodzenie somatyczne i trzewne, oraz inicjowanie neuroendokrynej odpowiedzi na uraz, której celem jest utrzymanie ustrojowej homeostazy (Wordliczek i Dobrogowski, 2002).

Percepcja

Ostatnim etapem procesu nocycypcji jest przetworzenie impulsu bólowego w bodziec o charakterze emocjonalnym. Procesy te zachodzą w korze mózgowej gdzie następuje ocena działającego bodźca i reakcja emocjonalna. Tu powstaje lęk, gniew, agresja oraz modele zachowań związane z zapamiętywaniem bólu (Wordliczek i Dobrogowski, 2002).

Zstępujący układ antynocyceptywny

Dopływ bodźców z pierwszorzędowych włókien bólowych do wyższych pięter OUN znajduje się pod kontrolą układów zstępujących oraz lokalnych mechanizmów regulujących na poziomie rogów tylnych rdzenia kręgowego. Pozwala to na modulowanie sygnałów bólowych (hamowanie, torowanie). Układy zstępujące antynocyceptywne obejmują: substancję szarą okołokomorową w podwzgórzu, substancję szarą okołowodociągową w śródmózgowiu (PAG), boczne i grzbietowo-boczne segmenty mostu, zawierające neurony adrenergiczne, brzuszno-dogłową część rdzenia przedłużonego zawierającą neurony adrenergiczne, brzuszno-dogłową część rdzenia przedłużonego, zawierającą neurony serotonergiczne zlokalizowane w jądrze wielkim szwu (Wordliczek i Dobrogowski, 2002). Układ ten tworzy hamujące połączenia synaptyczne w blaszce I, II, IV rogów tylnych rdzenia kręgowego. Modulacja bodźca bólowego odbywa się przez układy: noradrenergiczny, serotonergiczny, cholinergiczny, GABA-ergiczny oraz opioidowy.

Układ opioidowy

Na początku lat siedemdziesiątych w laboratoriach Kosterlitz i Snydera niezależnie od siebie udowodniono istnienie receptora opioidowego (Goldstein i wsp., 1971, Pert i Snyder, 1973, Simon i wsp., 1973, Terenius, 1973, Snyder, 1975). W 1975 roku zespół Hughes'a określił budowę dwóch peptydów, które nazwano enkefalinami (Met-enkefalina i Leu-enkefalina) (Hughes i wsp., 1975). Obserwacje reakcji farmakologicznych wywołanych przez różne opioidy pozwoliły w 1976 roku na postawienie hipotezy o istnieniu trzech klas receptorów opioidowych (Gilbert i Martin, 1976, Martin i wsp., 1976). Klasyfikacja została oparta na trzech różnych typach zespołów objawów powstałych u psów w zależności od użytych agonistów tj. morfiny, etyloketocyklazocyny i N-allylonormetazocyny. Założono, że każdy z zespołów objawów powiązany jest z określonym ligandem i w ten sposób dla każdej klasy wybrano oznaczenie od ligandu z jakim reaguje, a zatem μ dla

morfiny, κ dla etyloketocyklazocyny, σ dla N-allionormetazocyny. W 1977 roku Lord wysunął hipotezę o istnieniu kolejnego typu receptora opioidowego, który nazwano δ ponieważ szczególnie obficie występowała w powrózku nasiennym myszy (*ang. vas deferens*) (Lord i wsp., 1977). Ostatecznie zaproponowano utworzenie pięciu klas receptorów opioidowych (Tab. 2).

Tab. 2 Klasy receptorów opioidowych i ich główni agoniści

Typ receptora	agonista
μ	morfina
δ	enkefalin
ϵ	β -endorfina
σ	N-allionormetazocyna
κ	ketocyklazocyna

Powyższa klasyfikacja spotkała się z ostrą krytyką, dlatego też w 1996 roku IUPHAR zaproponował nową nomenklaturę dla receptorów opioidowych w oparciu o chronologię ich klonowania i tak receptor opioidowy typu δ został nazwany OP1, κ OP2, a μ OP3 (Alexander i wsp., 2008). Powyższa klasyfikacja nie przyjęła się w środowisku osób zajmujących się badaniem receptorów opioidowych i ich ligandów. Dlatego też, obecnie IUPHAR zaleca stosowanie wcześniejszej nomenklatury, wyróżniając trzy klasy receptorów opioidowych δ , κ , μ (Alexander i wsp., 2008).

Wraz z odkryciem różnych klas receptorów opioidowych trwały badania nad ich endogennymi ligandami. Wyniki prac pozwoliły na określenie w mózgu, przysadce mózgowej, rdzeniu kręgowym oraz w innych tkankach, związków o właściwościach morfinopodobnych, które objęto początkowo wspólną nazwą endorfiny, a z czasem nazwa ta ograniczyła się do związków dłuższych od Met-enkefaliny i wywodzących się z β -lipotropiny.

Endogenne peptydy opioidowe powstają ze swoich prekursorów w wyniku działania głównie dwóch enzymów enkefalinazy i aminopeptydazy N (Carr i wsp., 1991).

W zależności od rodzaju prekursora endogenne peptydy opioidowe dzieli się na:

- pochodzące z proopiomelanokortyny (POMC): β -endorfiny, enkefaliny
- pochodne proenkefaliny (PENK): Leu- i Met- enkefalina
- pochodne podwzgórzowej prodynorfiny (PDYN): dynorfina A i B, alfa-neoendorfina, rimorfina

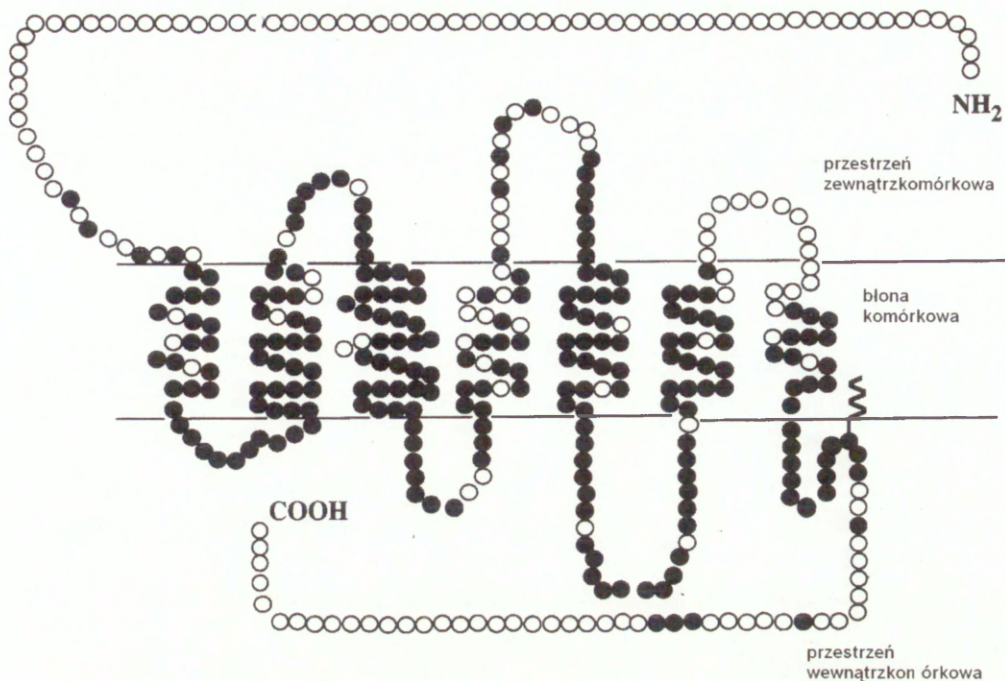
Endogenne peptydy opioidowe nie są selektywne tylko w stosunku do jednego typu receptora. Wyjątek stanowią odkryte w końcu lat dziewięćdziesiątych endomorfina-1 i endomorfina-2, które są wysoko selektywne do receptora typu μ (Zadina i wsp., 1999). Do dzisiaj nie udało się wyizolować ani określić prekursora endomorfina. Cechą łączącą wszystkie endogenne peptydy opioidowe jest występowanie aminokwasów: Tyr w pozycji 1 i Phe w pozycji 3 i/lub 4 sekwencji łańcucha peptydowego końca N.

Tab. 3 Prekursory endogennych peptydów opioidowych i ich produkty, miejsce występowania, i mechanizm działania

Prekursor	peptyd	Miejsce syntezy	Występowanie	Działanie/powinowactwo receptorowe
POMC	β -endorfina	Przedni płat przysadki mózgowej, neurony jądra łukowego podwzgórza	Podwzgórze, jądro pasma samolnego, wyniosłości przyśrodkowej, przedni i pośredni płat przysadki, osocze, śródmózgowie, jądra migdałowe, wzgórek dogrzebietowy pnia mózgu, hipokamp, most, rdzeń przedłużony	Przeciwbólowe przechodzi barierę krew -mózg, agonista receptora μ , ϵ , działanie przeciwłkowe $\mu > \delta$
PENK	enkefaliny	Podwzgórze przysadka, rdzeń nadnerczy	OUN, gałka biała, jądro ogoniaste, jądro półleżące, guzek węchowy, opuszki węchowe, przegroda, rdzeń kręgowy, nadnercza, sploty warstwy mięśniowej przewodu pokarmowego, mniej: śródmózgowie, hipokamp, kora mózdzku	Agonista receptora $\delta > \mu > \kappa$

PDYN	dynorfina		Śródmózgowie, rdzeń przedłużony, most, podwzgórze, tylny płat przysadki, rdzeń kręgowy, mózdzek, istota czarna, jądro ogoniaste, PAG, splot podśluzówkowy przewodu pokarmowego	Agonista receptora $\kappa > \mu > \delta$
	EM-1, EM-2	Podwzgórze, wzgórze, jądro migdałowe, jądro pół eżące, pień mózgu, rdzeń przedłużony, warstwa I i II rogów tylnych rdzenia kręgowego, rogi czuciowe DRG		μ

Receptory opioidowe wykazują podobną homologiczną budowę składającą się z ok. 400 aminokwasów (Reisine i Bell, 1993). Wszystkie trzy typy receptorów opioidowych związane są z białkami G. Struktura ich składa się z siedmiu transmebranowych hydrofobowych domen (TMI-TMVII). Trzy pętle (i1-i3) oraz koniec C skierowane są do wnętrza komórki, podczas gdy pozostałe trzy pętle (e1-e3) oraz koniec N znajdują się na zewnątrz (Ryc. 2). W rdzeniu kręgowym i w innych strukturach układu nerwowego receptory opioidowe mogą tworzyć heterodimery μ/δ i κ/δ , homomery, co diametralnie zmienia ich selektywność wiązania ligandów (Gomes i wsp., 2000). istnieje wiele farmakologicznie scharakteryzowanych podtypów receptorów μ , δ , κ będących wynikiem różnych potranslacyjnych przemian produktu genu kodującego receptory opioidowe.



Rys. 2 Schemat struktury ludzkiego receptora opioidowego typu μ . Kolor czarny-aminokwasy identyczne dla receptorów typu μ , δ , κ (na podst. Stanasila i wsp., 1998).

Substancja P budowa, działanie i dystrybucja

W latach trzydziestych ubiegłego wieku Ulf von Euler rozpoczął pracę, w laboratorium dr Henry'ego Dale, nad acetylocholiną. W tym celu wraz z Johnem Gaddum rozpoczęli cykl badań dotyczących uwalniania i dystrybucji acetylocholino w jelicie cienkim królika, drażniąc nerw błędny. Do przeprowadzenia tego eksperymentu używano ekstraktu z mózgu i jelita konia, który powodował skurcz izolowanego fragmentu jelita cienkiego. Skurcze nie były hamowane przez atropinę, co sugerowało, że musiały być wywoływane przez inny „czynnik” niż acetylocholina (Hokfelt i wsp., 2001). Odkrycie to zaowocowało pierwszą publikacją na temat substancji P (von Euler i Gaddum, 1931). W publikacji tej opisano „atropino oporny czynnik”, który jest zawarty zarówno w mózgu jak i jelicie, a który stymuluje mięśnie gładkie do skurczu oraz zmniejsza ciśnienie krwi. Badacze podjęli też próbę

izolacji nowoodkrytego „czynnika”. W tym celu przeprowadzili alkoholową ekstrakcję jelita końskiego i uzyskał suchy, stabilny proszek (Lembeck, 2008). Określenie „proszek” (powder) było prekursorem nazwy substancja P (Gaddum i Schild, 1935). W kolejnych latach opisano obwodowe działanie SP takie jak obniżanie ciśnienia krwi i stymulowanie kurczliwości jelita u zwierząt laboratoryjnych (Gernandt, 1942), zwiększenie przepływu krwi w przedramieniu człowieka (Pernow, 1963), czy wpływ na stymulację oddychania (von Euler i Pernow, 1956). Prace prowadzone w latach czterdziestych przez Pernowa nad dystrybucją SP w mózgu pokazały, że większe jej ilości znajdują się w istocie szarej niż w białej. Pernow zidentyfikował duże ilości SP w śródmózgowiu, międzymózgowiu, a także w podwzgórzu, natomiast w rdzeniu kręgowym wykazał wyższe stężenie SP w grzbietowych warstwach niż w brzusznych, a także obecność w nerwach obwodowych, częściowo w nerwach autonomicznych, zwojach kręgowych i układzie współczulnym (Pernow, 1953).

W początkowym okresie substancja P była charakteryzowana na podstawie następujących trzech cech:

- stymuluje skurcze izolowanego jelita cienkiego świnki morskiej mimo obecności atropiny, tryptaminy (acetylocholina, serotonina, lub histamina nie są zaangażowane w pośredniczeniu tego efektu)
- stymuluje skurcze dwunastnicy szczura (w przeciwieństwie do innych kinin, które nie posiadają tych możliwości)
- obniża wyraźnie ciśnienie krwi u szczurów przy podaniu dożylnym niezależnie od wcześniejszego podania atropiny (Leeman i Ferguson, 2000)

W 1970 roku, prawie 40 lat po opublikowaniu pierwszych doniesień von Eulera i Gaddumana na temat SP, Susan Leeman i współpracownicy zidentyfikowali SP w wołowym podwzgórzu jako jedenastoaminokwasowy peptyd H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gin-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Val-NH₂ (Chang i wsp., 1971), pierwsi go zsyntetyzowali (Tregear i wsp., 1971) i zastosowali metody izotopowe do jego oznaczania (Powell i wsp., 1973). Dekadę później SP została wprowadzona jako nowy związek do rodziny tachykinin, obok neurokininy A (NKA) i neurokininy B (NKB). Cechą łączącą wszystkie związki

z tej rodziny jest C-terminalna sekwencja **Phe-Xaa-Gly-Leu-Met-NH₂** (gdzie Xaa może być Phe lub Val) (Tab. 4).

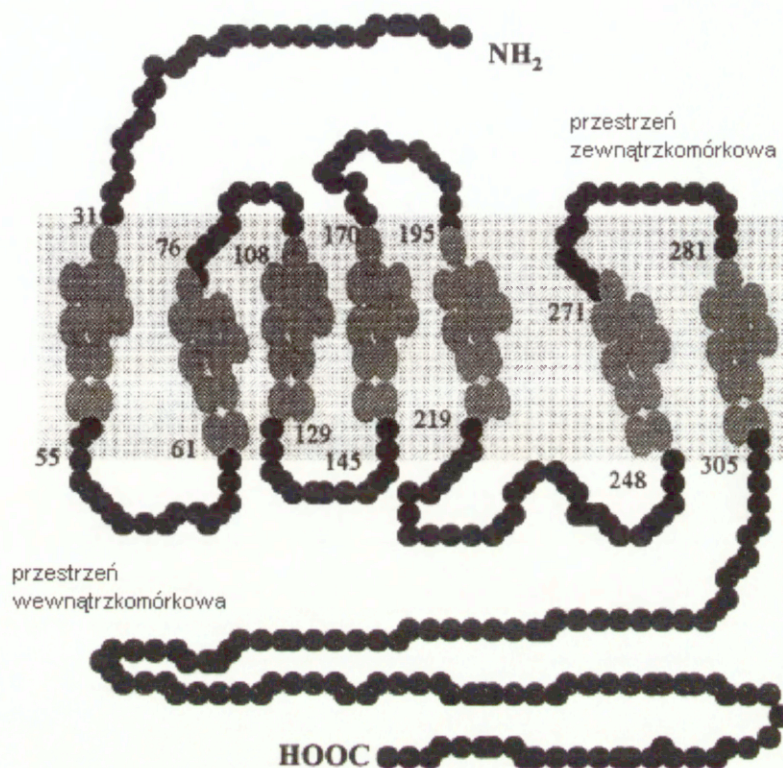
Tab. 4 Klasy receptorów neurokininowych i ich agoniści

receptor	agonista	sekwencja
NK-1	substancja P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
NK-2	neurokinina A	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
NK-3	neurokinina B	His-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂

Od lat pięćdziesiątych i prac Lembeck'a uważano, że SP może być neuroprzekaźnikiem zaangażowanym w przewodzenie sygnału bólowego z obwodu do rdzenia kręgowego, a równolegle jego obwodowe uwolnienie może być odpowiedzialne za rozszerzenie naczyń krwionośnych i neurogenne zapalenie. W latach siedemdziesiątych pojawiły się kolejne doniesienia na temat dystrybucji SP w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym (Hokfelt i wsp., 1975a), a lata osiemdziesiąte przyniosły odkrycie dwóch następnych neurokinin: neurokininy A i neurokininy B. Wszystko to doprowadziło do izolacji genów kodujących tachykininy (Nakanishi, 1987) i białek receptorowych (Nakanishi, 1991), a to z kolei zaowocowało wyizolowaniem silnych i selektywnych białkowych i niebiałkowych antagonistów (Maggi i wsp., 1993). Do dnia dzisiejszego poznano jeszcze dwie tachykininy: neuropeptyd K i neuropeptyd γ , jednak wiedza na temat ich właściwości fizjologicznych jest fragmentaryczna.

W 1987 r. Masu i wsp. sklonowali NK-2 receptor i powiązali jego budowę z grupą receptorów związanych z białkiem G. W momencie, kiedy sekwencja aminokwasowa została zbadana (Hershey i Krause, 1990, Shigemoto i wsp., 1990) określono, że ta grupa receptorów zawiera siedem hydrofobowych transmembranowych segmentów. Dla receptorów tachykininowych występujących u ludzi 40% sekwencji aminokwasowych jest identyczna dla NK-1, NK-2 i NK-3 (Gerard i wsp., 1993). Większe podobieństwo, ok. 75% występuje w cytoplazmatycznej sekwencji, natomiast

w transmembranowych domenach to podobieństwo jest niższe i wynosi ok. 70%.



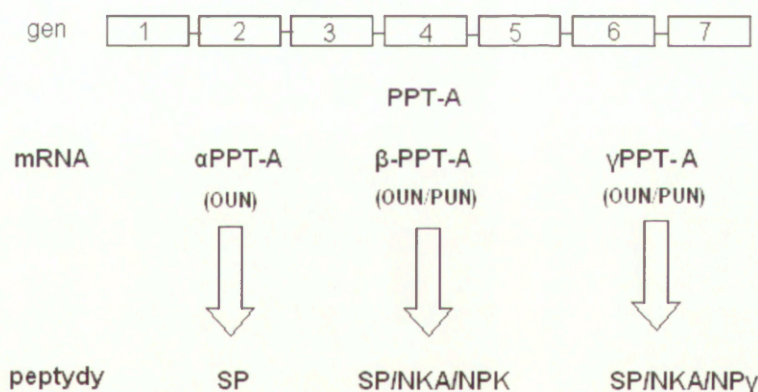
Ryc. 3 Schemat struktury ludzkiego receptora NK-1. (Regoli i wsp., 1994, Harrison i Geppetti 2001).

Biosynteza substancji P i klasyfikacja receptorów neurokininowych

Studia nad biosyntezą neuropeptydów pokazują, że związki te pochodzą z większych, zazwyczaj nieaktywnych prepropeptydów. Te prepropeptydy są syntetyzowane na siateczce endoplazmatycznej szorstkiej w ciele komórek peptydergicznych neuronów (peptidergic neurons). Tam też następuje enzymatyczne odcięcie hydrofobowej N-terminalnej sekwencji sygnałowej, a powstały propeptyd jest pakowany do pęcherzyków aparatu Golgiego. Te pęcherzyki są transportowane wzdłuż aksonu do zakończeń neuronu. Podczas transportu propeptyd podlega enzymatycznej obróbce do formy peptydu końcowego. Z powodu swojego rozmiaru i hydrofilowej natury

peptyd końcowy jest wydzielany na zasadzie egzocytozy (Persson i wsp., 1995).

Trzy różne typy mRNA dla substancji P zostały zidentyfikowane i wywodzą się one z jednego genu zwanego genem preprotachykininowym A (PPT-A) (Harrison i Geppetti, 2001). Alternatywne składanie (*splicing*), które doprowadziło do powstania tych form, w konsekwencji prowadzi do powstania trzech różnych preprotachykinin: α -PPT, β -PPT i γ -PPT. Wszystkie trzy prepropeptydy zawierają sekwencję aminokwasową typową dla substancji P, natomiast β -PPT i γ -PPT dają początek kolejnym tachykininom i tak z β -PPT powstanie neurokinina A (NKA) i neuropeptyd K, a z γ -PPT NKA i neuropeptyd γ (Nawa i wsp., 1984, Krause i wsp., 1987, MacDonald i wsp., 1989) (Ryc. 4) Ekspresja konkretnego mRNA jest gatunkowo i tkankowo zależna.



Ryc.4 Schemat biosyntezy SP i powiązanych z nim tachykinin. OUN- ośrodkowy układ nerwowy, PUN-obwodowy układ nerwowy, 1-7 egzony. (Na podst. Harrison i Geppetti, 2001).

Przy zastosowaniu różnych metod badawczych Erspamer zauważył różnice we właściwościach substancji P, neurokininy A i neurokininy B co zaowocowało odkryciem trzech różnych podtypów receptorów tachykininowych (Erspamer 1981, Lee i wsp., 1982, Mussap i wsp., 1993). W 1986 roku w Montrealu na spotkaniu poświęconemu substancji P i

neurokininom uzgodniono nomenklaturę nowych receptorów i określono je wspólną nazwą receptory neurokininowe NK (Henry, 1987). Współcześnie wyróżnia się trzy typy receptorów oznaczonych jako NK-1, NK-2, NK-3. Charakterystyka receptorów początkowo była przeprowadzona ze względu na preferencje i powinowactwo do receptorów endogennych ligandów i tak powinowactwo receptorowe dla NK-1 wynosiło odpowiednio SP>NKA>NKB, dla NK-2 NKA>NKB>SP, a dla NK-3 NKB>NKA>SP (Maggi i wsp., 1993, Snijdelaar i wsp., 2000). Chociaż klasyfikacja oparta na powinowactwie ligandów nie jest doskonała, ponieważ wiele badań wskazuje, że muszą występować jeszcze podklasy receptorów, to doprowadziła do rozwoju badań nad agonistami i antagonistami receptorów tachykininowych.

Zastosowanie znakowanych izotopowo ligandów jak i metod biologii molekularnej pozwoliło precyzyjnie opisać dystrybucję receptorów neurokininowych w organizmie. Receptory NK-1 znaleziono zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, głównie w prążkowie i rdzeniu kręgowym (Hu i wsp., 1997), jak i w przewodzie pokarmowym, pęcherzu moczowym (Beaujouan i wsp., 1986, Mantyh i wsp., 1988), czy nabłonku dróg oddechowych (Meini i wsp., 1993). Podobnie receptor NK-2 zidentyfikowano zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym jak i w przewodzie pokarmowym, czy w mięśniach gładkich dróg oddechowych (Tsuchida i wsp., 1990, Meini i wsp., 1993). Receptor NK-3, jak inne receptory z tej rodziny, znajduje się w ośrodkowym układzie nerwowym głównie w korze mózgowej i rogach tylnych rdzenia kręgowego (Dam i wsp., 1990), ale też pewne ilości znaleziono w tkankach obejmujących pęcherz moczowy i jelito cienkie (Tsuchida i wsp., 1990).

Substancja P a transmisja sygnału bólowego

Bodźce termiczne (Go i Yaksh, 1987), mechaniczne (Kuraishi i wsp., 1985), elektryczna stymulacja cienkich niezmielinizowanych włókien (Go i Yaksh, 1987) lub podanie kapsaicyny (Takano i wsp., 1993), czyli czynniki uszkodzające tkanki i ub je drażniące skutkuje uwolnieniem substancji P w rdzeniu kręgowym. Jest to dowód, że w tym przypadku SP działa jak neuroprzebiegacz, który bierze udział w szybkiej odpowiedzi na działający



czynnik uszkodzający. Potwierdzeniem tych obserwacji są wyniki badań które wskazują, że antagoniści receptora NK-1 blokują odpowiedź w rdzeniu kręgowym wywołaną przez te czynniki, a podpajęczynówkowe podanie substancji P wywołuje ból u badanych zwierząt (Piercey i wsp., 1981, Matsamura i wsp., 1985). Jak wspomniano wyżej, SP jest uwalniana pod wpływem różnych czynników uszkodzających, działających na obwodzie, ale nie każdy czynnik uszkodzający doprowadza do uwolnienia SP. Obserwuje się sytuacje, w których stymulacja bodźcem termicznym powoduje uwolnienie somatostatyny, a nie SP. Uwolnienie SP następuje jedynie w przypadku, kiedy impuls uszkodzający jest jednocześnie silny i długo działający (Duggan i wsp., 1987, 1988, Duggan, 1992). Z kolei w badaniach pobudzenia komórek rogów tylnych rdzenia kręgowego powodowanego przez jonoferyczne podanie SP stwierdzono opóźniony początek odpowiedzi zwykle o 20-40 s i jej przedłużenie do 30-90 s. (Randic i Miletic, 1977, Nowak i Macdonald, 1982). W kolejnych badaniach stwierdzono, że pierwsza, szybka odpowiedź na bodziec bólowy jest niezależna od substancji P, ponieważ antagoniści receptora NK-1 nie potrafią jej zablokować. Antagoniści receptora potrafią zablokować tylko opóźnioną w czasie odpowiedź bólową (Radhakrishnan i Henry, 1991). Powyższe dane pokazują, że SP jest zaangażowana w powolną transmisję. Ta odpowiedź jest na tyle wolna, że uczestniczą w niej inne mechanizmy niż w szybkiej reakcji bólowej. Zatem w szybką transmisję muszą być włączone inne neuroprzekaźniki np. glutaminian i asparaginian.

Wyniki przeprowadzonych badań skłaniają do wysunięcia wniosku, że SP może uczestniczyć w szybkiej odpowiedzi na działający czynnik uszkodzający lub w wolnej, w zależności od rodzaju czynnika uszkodzającego.

Wzajemne oddziaływania pomiędzy peptydami opioidowymi a substancją P

Farmakologiczne dowody wskazują na wzajemne, funkcjonalne powiązanie układu opioidowego i tachykininowego (Kosson i wsp., 2005). Bezpośrednie podanie odpowiednio dużej dawki SP (mikrogramy) do lędźwiowej części przestrzeni podpajęczynówkowej rdzenia kręgowego wywołuje u gryzoni hiperalgezę oraz indukuje zachowanie takie jak drapanie, gryzienie, lizanie tylnej łapy. Badania eksperymentalne pokazują, że wyżej opisane efekty działania SP można zahamować podając agonistów układu opioidowego (Hylden i Wilcox, 1983). Z przeprowadzonych badań wynika, że opioidy działają hamująco na uwolnienie SP, co zaobserwowano również w badaniach *in vitro* (Jesse i Iverson, 1977, Chang i wsp., 1989) i w warunkach *in vivo* z zastosowaniem morfiny (Yaksh i wsp., 1980). Z kolei nalokson, antagonistą układu opioidowego, zwiększa uwalnianie SP w rdzeniu kręgowym, jak również nasila ból wywołany w drugim etapie testu formalinowego. Stewart i wsp. przedstawili właściwości analgetyczne substancji P podawanej zarówno ośrodkowo i obwodowo (Stewart i wsp., 1976). Po podaniu peptydu do komory mózgu myszy obserwowany był wzrost latencji na bodziec termiczny w teście gorącej płytki. Efekt ten był blokowany podaniem naloksonu, co z kolei wskazywało na wtórną aktywację endogennego układu opioidowego (Stewart i wsp., 1976). Podobne efekty uzyskano po podaniu peptydu obwodowo. Wysłunięto hipotezę, że farmakologiczne działanie SP jest spowodowane uwolnieniem endogennych neuropeptydów związanych z powstaniem analgezji lub przez powstanie aktywnych analgetycznie metabolitów SP. Hipoteza ta została potwierdzona w latach późniejszych kiedy wykazano, że SP jest metabolizowana do aktywnych farmakologicznie fragmentów (Lei i wsp., 1991). Wykazano również, że fragment SP(1-7) wywołuje odwracalną naloksonem antynocycępcję po podaniu dokomorowym u myszy, jak też hiperalgezę po podaniu podpajęczynówkowym u szczura (Goett i Larson, 1994). Frederickson i wsp. przedstawili ponadto dane świadczące, że SP podawana w nanogramowych dawkach do przestrzeni podpajęczynówkowej

w teście gorącej płytki wykazuje właściwości analgetyczne (Frederickson i wsp., 1978). Efekt analgetyczny nie był obserwowany jeśli przed podaniem SP podano nalokson. Stąd autorzy wysunęli hipotezę, że krzywa działania SP podanej podpajęczynówkowo w teście gorącej płytki, przypominająca kształtem dzwon, może być wynikiem dwojakiego, przeciwstawnego działania w mózgu (Frederickson i wsp., 1978). W przypadku małych dawek substancji P, powstaje odwracalna naloksonem analgeza, prawdopodobnie związana z uwolnieniem endogennych peptydów opioidowych, natomiast przy wyższych dawkach następuje bezpośrednia aktywacja receptorów postsynaptycznych NK-1 i aktywowanie drogi przewodzenia bólu.

Kolejne badania ekperymentalne na grupie szczurów pokazały, że niskie dawki SP w połączeniu z najniższymi skutecznymi (efektywnymi) dawkami MF podanymi do przestrzeni podpajęczynówkowej powoduje wzmocnienie efektu analgetycznego MF w teście cofania ogona. (Kream i wsp., 1993). Efekt farmakologiczny był blokowany przez wcześniejsze podanie naloksonu, ale nie antagonisty SP, CP-96,345, sugerując tym samym, że wzmocnienie odpowiedzi analgetycznej odbywa się przez stymulację wydzielania endogennych peptydów opioidowych, a nie przez bezpośrednią aktywację receptorów tachykininowych. Podobne wyniki uzyskano przy podaniu obwodowym SP w połączeniu z MF. Natomiast przewlekłe, parenteralne podanie MF w połączeniu z SP skutkowało znacznym wydłużeniem odpowiedzi opioidowej, przypuszczalnie na skutek hamowania rozwoju tolerancji opioidowej (Kream i wsp., 1993). W innych badaniach wykazano, że N-końcowy fragment SP(1-7) opóźniał rozwój tolerancji morfinowej, jeśli był podany przed podaniem opiatu (Kreeger i Larson, 1996). Z kolei Lipkowski i wsp. wykazał, że 11 aminokwasowy antagonistą SP wzmacnia i wydłuża antynocyceptywną aktywność agonisty opioidowego, tj. bifaliny (Lipkowski i wsp., 1987). Efekt ten był odwracany naloksonem, wskazując tym samym na opioidową specyficzność połączonych efektów farmakologicznych. W innej pracy Lipkowski i wsp. przedstawił silne i wydłużone efekty analgetyczne peptydu łączącego w swojej budowie strukturę podobną do β -kazomorfiny z antagonistą SP. Stwierdził oni, że efekt analgetyczny wywołany jest równoczesną aktywacją receptorów opioidowych i blokadą receptorów NK-1 (Lipkowski i wsp., 1994).

Omówione powyżej wyniki badań wskazują, że rdzeniowy układ tachykininowy i opioidowy w sposób bezpośredni na siebie oddziałują, modulując miejscową odpowiedź nocyceptywną.

Podstawy konstrukcji związków hybrydowych

W ciągu ostatnich lat rośnie wiedza na temat substancji P i roli jaką pełni w transmisji sygnału bólowego. Dla przykładu rola SP w patofizjologii klinicznych zespołów takich jak zapalenie jelita grubego, zapalenie stawów, śródmiąższowe zapalenie pęcherza moczowego, choroby przebiegające z bólem zapalnym czy neuropatycznym, staje się coraz wyraźniejsza. Można się spodziewać, że nowe koncepcje i metody leczenia bólu zaowocują odkryciem leków opartych na modyfikacji SP, co pomoże w walce z bólem pochodzącym właśnie z takich stanów.

Jak przedstawiono wcześniej, zarówno substancja P jak i endogenne peptydy opioidowe są głęboko zaangażowane w transmisję sygnału bólowego. Badania Stewarta, Fredericksona i innych dowiodły, że SP podana *i.v.* lub *i.c.v.* powoduje hiperalgezę oraz w niskich dawkach analgezę odwracalną naloksonem. Postawiono wtedy hipotezę, że odmienny efekt działania SP(1-11) na poziomie rdzenia kręgowego jest mediowany przez dwa odmiennie receptory, C-terminalny receptor, który pośredniczy w nocyceptywnym działaniu SP(1-11) i N-terminalny receptor, który mediuje antynocyceptywny efekt (Stewart i wsp., 1976, Frederickson i wsp., 1978, Stewart i wsp., 1982). Podczas gdy SP(1-11) może być głównym ligandem dla tych receptorów to, C- i N-terminalne fragmenty rozpadu SP mogą działać jako niezależne, endogenne ligandy. Ścieżka enzymatycznego rozpadu SP(1-11) *in situ* została przedstawiona w badaniach Lee i Nyberga, natomiast obecność SP(1-7) i C-terminalnych fragmentów SP w homogenacie mózgu szczura i rdzenia kręgowego wykazał Sekurada, a igwe opisał w mysim rdzeniu kręgowym, w warunkach *in vitro* obecność N-terminalnych fragmentów takich jak: SP(1-4), SP(1-7), SP(1-9) oraz C-terminalnych takich jak SP(2-11) i SP(5-11) (Lee i wsp., 1981, Nyberg i wsp., 1984, Sakurada i wsp., 1985, igwe i wsp., 1988). W kolejnych badaniach wykazano, że N-terminalne metabolity SP(1-7) powodują dawkozależną

antynocycję zarówno w teście cofania ogona jak i gorącej płytki. Efektu tego nie obserwowano po podaniu C-terminalnych fragmentów SP (Hall i Stewart 1983, Cridland i Henry, 1988). W innych badaniach wykazano, że podpajęczynówkowe podanie fragmentów SP(5-11) wywoływało takie zachowania jak gryzienie i drapanie u badanych zwierząt. Są to zachowania opisywane jako typowe po podaniu SP(1-11). Reakcję tą można było zahamować podając SP(1-7) (Igwe i wsp., 1988). Dowiedziono również, że wielokrotna podpajęczynówkowa iniekcja SP(1-11) u badanych zwierząt zmniejszała opisywane zachowanie prawdopodobnie przez nagromadzenie N-terminalnych fragmentów SP(1-11) (Larson, 1988, Igwe i wsp., 1988).

SP i jej metabolity mają także wpływ na uwalnianie aminokwasów pobudzających (EAAs) takich jak glutaminian i asparaginian do przestrzeni synaptycznej w rogach tylnych rdzenia kręgowego. Dowody, które sugerują wzajemne powiązanie pomiędzy SP a EAAs w rdzeniu kręgowym to:

1. SP(1-11) i Glu współistnieją w neuronach zwojowych rogów grzbietowych szczura i małpy (Battaglia i Rustioni, 1988)
2. SP(1-11) powoduje uwolnienie Glu z rogów grzbietowych rdzenia kręgowego nowonarodzonych szczurów i żaby (Kawagoe i wsp., 1985, 1986)
3. SP(1-11) lub nocycceptywna stymulacja powoduje wyraźny wzrost uwolnienia Asp i Glu w rogach grzbietowych przytomnych szczurów (Skilling i wsp., 1988, Smullin i wsp., 1990)

W kolejnych badaniach Skilling i wsp. dowodzili, że C-terminalny koniec SP lub jej C-terminalne fragmenty są odpowiedzialne za zwiększenie wydzielania EAAs, natomiast fragment SP(1-7) powodował zmniejszenie tego wydzielania (Skilling i wsp., 1990). Dodatkowo, Igwe i wsp. postawili hipotezę, że SP(1-7) posiada swoje własne receptory, co mogłoby tłumaczyć wyjątkowe właściwości farmakologiczne i fizjologiczne tego fragmentu (Igwe i wsp., 1990). Pokazał, że miejsce wiązania dla fragmentu SP(1-7) w mysim OUN jest inne niż receptory tachykininowe czy opioidowe. Dodatkowo wykazano, że SP jak i jej C-terminalne fragmenty wykazują słabe powinowactwo do tego miejsca wiązania (Igwe i wsp., 1990, Botros, 2008).

Różnorodne działanie SP i jej fragmentów leży u podstaw założenia o dualistycznym działaniu SP w stosunku do transmisji sygnału bólowego (Skilling i wsp., 1990). Założenie to stanowi podstawę koncepcji konstruowania związków hybrydowych jako kompozycji łączącej w swojej budowie opioidy i SP. Związki o takiej budowie stanowią nową drogę dla leków o działaniu analgetycznym. Ponieważ interakcje pomiędzy SP, a opioidami w świetle obecnych badań to mozaika wzajemnych, często skomplikowanych oddziaływań, względna równowaga pomiędzy aktywnymi farmakoforami tzn. tachykininowym i opioidowym, ma zasadnicze znaczenie dla ostatecznej aktywności nowosyntetyzowanej cząsteczki-hybrydy.

Pierwsze konstruowane związki hybrydowe oparte były na założeniu, że działanie SP i opioidów w transmisji sygnału bólowego jest przeciwstawne. Zatem związek hybrydowy, który z jednej strony posiadałby farmakofor opioidowy a z drugiej farmakofor będący antagonistą SP, mógłby być niezwykle użyteczny w modulowaniu bólu. Konstruowanie takiego związku oparte było na wcześniejszych opisanych eksperymentach pokazujących, że jednoczesne podanie peptydu opioidowego ze słabym antagonistą SP znacznie wzmacnia opioidową analgezję (Misterec i wsp., 1994). Pierwszym związkiem spełniającym powyższe kryteria był AWL60, peptyd, który łączył w swojej budowie endomorfino-podobny mimetyk z antagonistą SP. Badania *in vitro* i *in vivo* potwierdziły ogromny potencjał związków o takiej budowie w modulowaniu antynocycypcji (Lipkowski i wsp., 2006). Bazując na tych doświadczeniach opracowano kolejny peptyd o nazwie AA501. Związek ten w swojej budowie łączył silnego agonistę opioidowego jakim jest tetrapeptyd wywodzący się z bifaliny w połączeniu z N-benzylloksykarbonylo-tryptofanem antagonistą SP. AA501 po podaniu *i.t.* powodował silną antynocycypcję w modelu bólu ostrego, tak samo jak w modelu bólu zapalnego czy neuropatycznego. Wielokrotne podanie AA501 skutkowało rozwojem tolerancji w wolniejszym tempie w porównaniu do czystego opioidu (Maszczyńska, 1999, Maszczyńska Bonney i wsp., 2004).

Sukces badań z użyciem związków hybrydowych oddziałujących na układ opioidowy i neurokininowy pozwolił na wykonanie następnego kroku w modulowaniu cząsteczki. Wychodząc z założenia, że SP w wysokich dawkach działa nocyceptywnie, natomiast niskie dawki lub jej metabolity

zmniejszają ból, skonstruowanie związku hybrydowego działającego agonistycznie na te dwa układy wydało się racjonalne. Poprzez fragment agonistyczny do receptorów NK-1 układ tachykininowy nie zostaje wyłączony i dzięki temu są zachowane liczne mechanizmy samoregulujące uwalnianie SP (Lipkowski i wsp., 1982, 1983), obejmujące aktywację peptydaz, modulację wiązania opioidów do swoich receptorów, wpływ na szlaki serotoniny i NMDA. Selektywna i wyłączna farmakologiczna aktywacja systemu opioidowego może zaburzyć wzajemne powiązania pomiędzy układem opioidowym a tachykininowym poprzez aktywację układów kompensacyjnych, co powoduje zwiększony wyrzut SP do przestrzeni synaptycznej, rozwój allodynii, hiperalgizji, tolerancji i innych niekorzystnych reakcji spowodowanych stosowaniem opioidów. Natomiast jednoczesna aktywacja układu opioidowego i tachykininowego w tym momencie wydaje się słusznym podejściem w konstruowaniu związków hybrydowych, które w jednej cząsteczce łączyłyby cechy agonisty układu opioidowego i tachykininowego.

2. Cel pracy

Jednym z problemów stosowania analgetyków opioidowych w medycynie praktycznej jest występowanie wielu objawów niepożądanych takich jak depresja oddechowa, zaparcia, uzależnienia, a przy dłuższym stosowaniu, tolerancja na ek. Dlatego też poszukuje się nowych związków, które mogłyby zastąpić tradycyjne, selektywnie działające opioidy. Nasz zespół promuje oryginalną koncepcję opracowania nowych analgetyków o szerokim zakresie działania na wiele systemów biorących udział w regulacji poziomu sygnałów bólowych. Jedną z grup proponowanych związków stanowią hybrydy farmakoforów opioidowych i tachykininowych. W Zakładzie Neuropeptydów IMDiK PAN zsyntetyzowano peptyd o symbolu AWL3106, który łączy w swojej budowie dwa komponenty - peptyd opioidowy, czyli dermorfinę oraz aktywny fragment peptydu tachykininowego, czyli substancję P (SP(7-11)).

Celem pracy doktorskiej była charakterystyka farmakologiczna nowego związku o nazwie AWL3106 oraz porównanie jego właściwości ze znanymi opioidami.

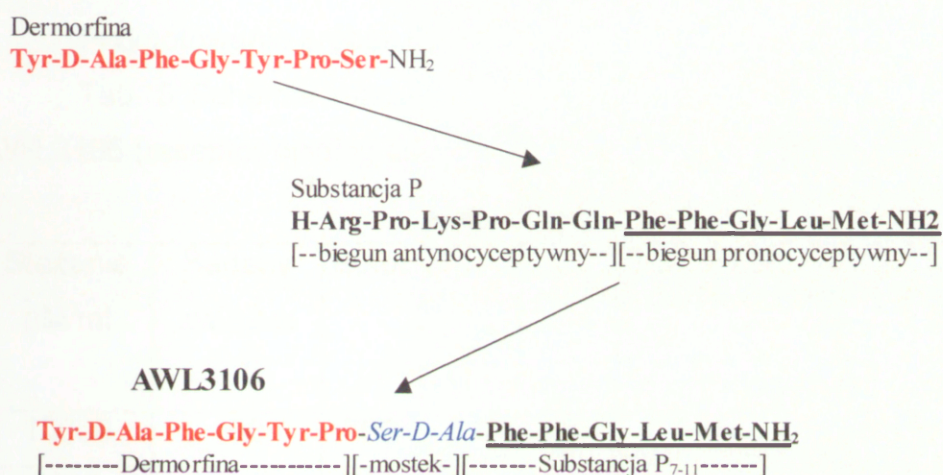
II

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Materiał i metody

1.1. Synteza związku hybrydowego

Synteza związku hybrydowego została przeprowadzona w Zakładzie Neuropeptydów I MDiK PAN wg założeń przedstawionych na schemacie:



Ryc. 5 Opracowanie struktury związku hybrydowego AWL3106.

1.2. Badania doświadczalne

1.2.1. Badania *in vitro*

1.2.1.1. Izolacja błon komórkowych mózgu szczura

Materiał badawczy został przygotowany wg modyfikacji metody Zadina i wsp. (Zadina i wsp., 1994). Szczury o masie 225-250 g dekapitowano, pobierano mózg, oddzielano i usuwano mózdzek a pozostałą część natychmiast umieszczano w homogenizatorze gdzie była homogenizowana w 20 objętościach buforu 50 mM Tris HCl (pH 7,4). Otrzymany homogenat wirowano przy 23000 rpm przez 15 min w temperaturze 4⁰C. Supernatant odrzucono, a osad przemyto 20 objętościami buforu Tris HCl. Tak otrzymany

homogenat poddano inkubacji w temp. 25°C przez okres 30 min, po czym ponownie wirowano przez 15 min, przy 23000 rpm. Ponownie supernatant odrzucono, a pozostały osad przemyto 20 objętościami buforu Tris HCl. Tak przygotowane błony komórkowe używano w dalszej części doświadczenia badania wiązania do receptorów.

1.2.1.2. Badanie wiązania peptydu AWL3106 do receptorów μ i δ

Przygotowanie próbek do analizy przeprowadzono wg schematu:

Tab. 5 Schemat rozcieńczeń związków w badaniu wiązania peptydu AWL3106 (receptor binding assay) do receptorów μ i δ

Stężenie nM/mi	Badany związek μ l	Bufor μ l	Radioligand [³ H]DAMGO μ l	Radioligand [³ H]Deltorfina μ l	Błony komórkowe μ l
10000	100	700	100	100	100
3000	100	700	100	100	100
1000	100	700	100	100	100
300	100	700	100	100	100
100	100	700	100	100	100
30	100	700	100	100	100
10	100	700	100	100	100
3	100	700	100	100	100
1	100	700	100	100	100
0,3	100	700	100	100	100
TB		800	100	100	100
NsB		800	100	100	100

TB (total binding) wiązanie całkowite

NsB (nonspecific binding) wiązanie niespecyficzne

Bufor: 50 mM Tris HC (pH 7,4), 1,0 mg/ml BSA-albumina wołowa, 30 μ M bestatyna, 30 μ g/ml bacytracyna, 10 μ M kaptopril, 0,1 mM PMSF-fuorek fenyliometylosulfonowy.

Próbki inkubowano w temp. 25⁰C przez okres jednej godziny. Po inkubacji próbki poddano filtracji wykorzystując aparat Brandel Harvester (Mode M-24 Cel Harvester) i filtry GF/B (Whatman). Filtry przemywano trzykrotnie 2 m zimnej (4⁰C) sol fizjologicznej. Następnie filtry przełożono na 24-dołkową płytkę i zalano roztworem scyntylacyjnym (Optiphase supermix PerkinElmer). Dla każdego stężenia [3H]DAMGO lub [3H]Deitorfiny i badanego związku wykonano dwa powtórzenia, a eksperyment przeprowadzono dwukrotnie. Oznaczenie poziomu promieniowania wykonano na liczniku MicroBeta LS, 3 detectorowym, TriLux (firmy ParkinElmer).

W każdym z doświadczeń badania wiązania badanego peptydu do receptorów opioidowych obliczano procent wiązania dla wzorca oraz badanego peptydu wg wzoru:

$$\% \text{ wiązania} = \frac{\text{średnie promieniowanie próbki} - \text{wiązanie niespecyficzne}}{\text{wiązanie specyficzne}} \times 100$$

Wiązanie specyficzne obliczano odejmując od wiązania całkowitego wiązanie niespecyficzne. Szczegółowej analizy dokonano przy użyciu oprogramowania komputerowego Graph Pad PRISM. Wynik przedstawiono jako wartość IC₅₀ ± SEM.

1.2.2. Badania *in vivo*

Badania wykonano na szczurach Wistar, samcach o masie ciała 225-250g. Związki podawano dożylnie (*i.v.*) (żyła szyjna zewnętrzna) i podpajęczynówkowo (*i.t.*). Podawane peptydy zostały zsyntetyzowane w Zakładzie Neuropeptydów iMDiK PAN wg założeń przedstawionych w poprzednim podrozdziale. Poddane badaniom zwierzęta podzielono na grupy w zależności od rodzaju i dawki badanego preparatu (Tab. 8). Grupę kontrolną stanowiły szczury, którym podano 0,9 % NaCl (Polf). Grupa ta stanowiła odniesienie dla wszystkich innych grup.

Tab. 6 Podział zwierząt na grupy

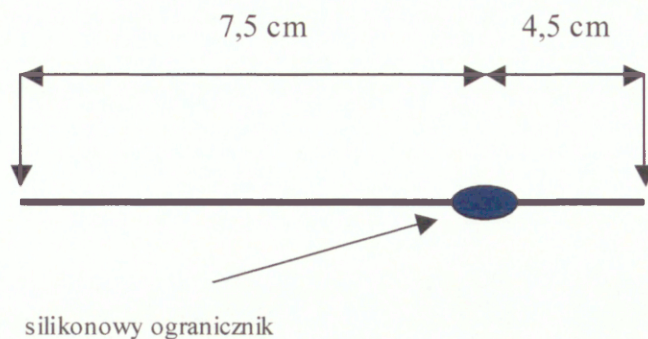
Związek	Droga podania	Grupa	Dawka	Liczba zwierząt
AWL3106	<i>i.v.</i>	1	1 $\mu\text{mol/kg}$	6
		2	2 $\mu\text{mol/kg}$	6
		3	5 $\mu\text{mol/kg}$	6
Morfina	<i>i.v.</i>	1	2 $\mu\text{mol/kg}$	8
		2	6 $\mu\text{mol/kg}$	7
		3	10 $\mu\text{mol/kg}$	4
AWL3106 tol.	<i>i.v.</i>	1	5 $\mu\text{mol/kg}$	5
Morfina tol.	<i>i.v.</i>	1	10 $\mu\text{mol/kg}$	4
AWL3106	<i>i.t.</i>	1	0,01 nmol	9
		2	0,025 nmol	6
		3	0,1 nmol	6
		4	0,5 nmol	6
Dermorfina	<i>i.t.</i>	1	0,001 nmol	7
		2	0,01 nmol	7
		3	0,1 nmol	6
Dermorfina + SP(7-11)	<i>i.t.</i>	1	0,01+0,001 nmol	6
		2	0,01+0,01 nmol	6
		3	0,01+0,1 nmol	6
	<i>i.t.</i>	1	0,1+0,001 nmol	7
		2	0,1+0,01 nmol	7
		3	0,1+0,1 nmol	7
SP(7-11)	<i>i.t.</i>	1	0,001 nmol	6
		2	0,01 nmol	5
		3	0,1 nmol	7
0,9 % NaCl	<i>i.t.</i>	1		7

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Dyrektora Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN oraz Lokalnej Komisji Etycznej. Każdy eksperyment składał się z operacji w znieczuleniu ogólnym podczas którego odbywała się implantacja cewnika do żyły szyjnej zewnętrznej, lub do przestrzeni podpajęczynówkowej, a następnie serii badań oceniających działanie przeciwbólowe oraz zachowanie zwierząt. Wszystkie preparaty podawane *i.v.* i *i.t.* były rozpuszczone w sterylnym 0,9 % NaCl (Polfa). Temperatura podawanych związków była temperaturą pokojową. Zwierzęta przebywały w standardowych warunkach mając nieograniczony dostęp do wody i pokarmu. Pomiarów dokonywano w stałym cyklu, w jednakowym odstępie czasu od implantacji cewnika (druga doba), o tej samej porze dnia. Każdy szczur użyty był tylko do jednej serii doświadczeń. Wyjątek stanowiły badania tolerancji gdzie szczurom podawano peptyd przez pięć kolejnych dni a rozwój tolerancji oceniono jako różnicę w efekcie wyrażoną w jednostkach MPE pomiędzy dniem rozpoczęcia badania, a jego zakończenia.

1.2.2.1 Przygotowanie zwierząt do doświadczeń

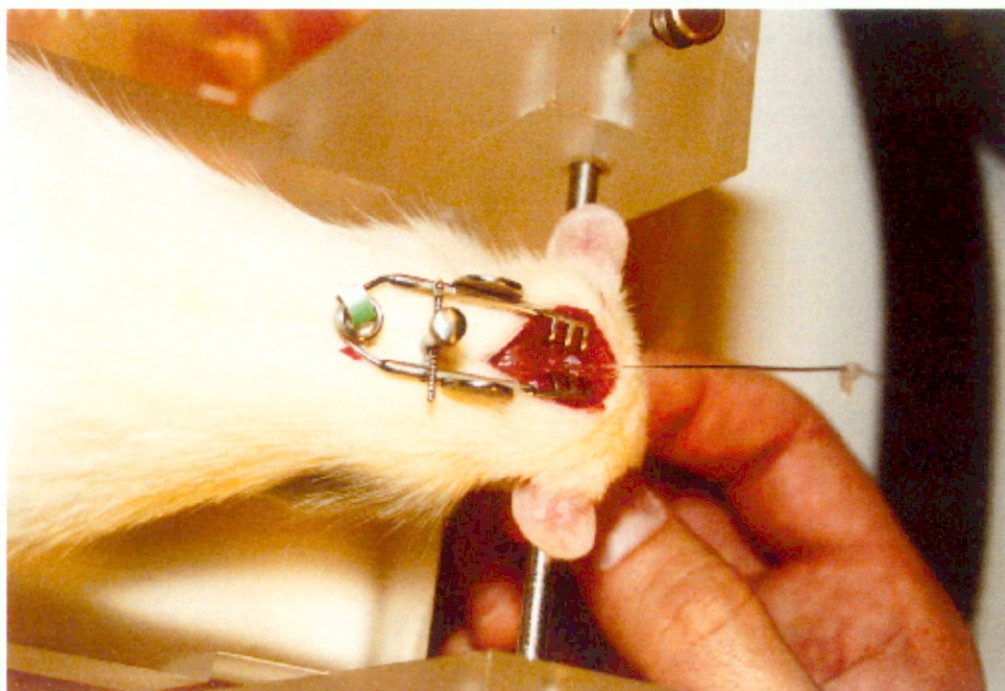
Podpajęczynówkowa implantacja cewnika

Operacja implantacji cewnika do przestrzeni podpajęczynówkowej odbywała się wg metody opisanej przez Yaksh i Rudy z pewnymi modyfikacjami (Yaksh i Rudy, 1976). Do przestrzeni podpajęczynówkowej w odcinku szyjnym kręgosłupa wprowadzono silikonowy cewnik (Silastic Laboratory Tubing nr kat. 508-001, Dow Corning Corporation) o średnicy zewnętrznej 0,64 mm, średnicy wewnętrznej 0,3 mm i długości 12 cm. W odległość 7,5 cm od końca cewnik posiadał ogranicznik wykonany z miękkiego kleju silikonowego, co pozwalało na precyzyjną instalację w przestrzeni podpajęczynówkowej. Wystający na zewnątrz 4,5 cm odcinek umożliwiał połączenie z igłą 30G strzykawki Hamiltona o pojemności 25 μ l. Tak przygotowany cewnik miał pojemność 10 μ l.



Ryc. 6 Schemat cewnika wprowadzanego do przestrzeni podpajęczynówkowej.

Zabieg operacyjny odbywał się w znieczuleniu ogólnym wziewnym. Szczurom podano mieszaninę halotanu (Narkotan firmy Leciva a.s.) i tlenu w stężeniach 0,5:3,5 vol%. Po wygoleniu sierści z okolicy operowanej, głowę szczura umieszczono w aparacie stereotaktycznym. Nacięcie skóry długości 1,5 cm wykonano w linii pośrodkowej, tylnej wzdłuż kręgosłupa od głowy w kierunku doogonowym. Po dotarciu do mięśni pierwszą warstwę rozcięto, drugą rozpreparowano „na tępo” docierając do błony podstawnej (szczytowo potylicznej). Następnie głowę szczura skierowano do dołu i po uzyskaniu dogodnego dostępu do błony podstawnej nacięto ją wykonując dwa cięcia w kształcie litery T. Po wykonaniu nacięcia, o czym świadczył pojawiający się klarowny płyn mózgowo-rdzeniowy, wprowadzono silikonowy cewnik, tak by jego dłuższy koniec znajdował się na wysokości pierwszego kręgu lędźwiowego. W celu łatwiejszego wprowadzania cewnika usztywniono go, wprowadzając do wnętrza metalową, sprężystą prowadnicę. Po instalacji na żądanej głębokości i usunięciu prowadnicy, cewnik umocowano szwem stabilizacyjnym, po czym zaszyto mięśnie, i skórę. Na zakończenie cewnik przepłukano jałowym roztworem soli fizjologicznej, a koniec zabezpieczono silikonowym klejem.



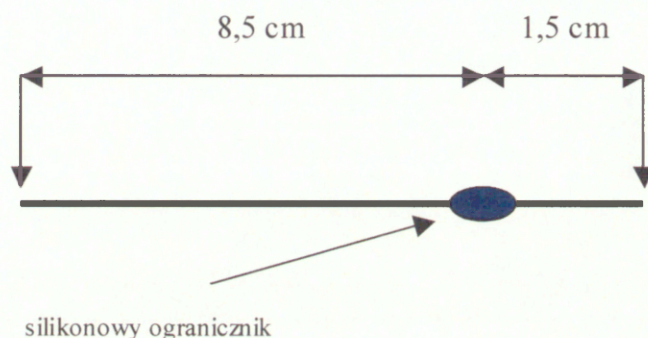
Ryc. 7 *Wprowadzenia cewnika do przestrzeni podpajęczynówkowej.*

Po wyprowadzeniu ze znieczulenia ogólnego szczury umieszczono w sali pooperacyjnej, w osobnych klatkach, na okres 48 godzin. Po dwóch dobach przeprowadzano właściwy eksperyment z użyciem badanych związków. Wcześniej zwierzęta były przyzwyczajane do warunków w jakich będzie przeprowadzony eksperyment (temperatura, hałas, sprzęt, otoczenie). Miało to na celu zmniejszenie wpływu stresu na wynik badania.

Implantacja cewnika do żyły szyjnej zewnętrznej

Zabieg był wykonywany w znieczuleniu ogólnym wg schematu opisanego wyżej. Szczura ułożono w pozycji grzbietowej z odwiedzionymi kończynami co umożliwiało swobodny dostęp do okolicy szyjnej lewej. Miejsce operowane wygolono i nacięto w kierunku doogonowym. Następnie mięśnie rozpreparowano „na tępo” tak by uzyskać dostęp do żyły szyjnej zewnętrznej. Na tak wypreparowanym naczyniu założono dwie podwiązki w odległość od siebie 1 cm. Następnie wykonano nacięcie prostopadłe do przebiegu naczynia i wprowadzono wcześniej przygotowany cewnik (Silastic Laboratory Tubing Nr kat. 508-003, Dow Corning Corporation) o średnicy

zewnętrznej 1,19 mm i wewnętrznej 0,64 mm (Ryc. 8). Cewnik umocowano szwami przytwierdzającymi, zdjęto podwiązkę dosercową, po czym wolny koniec wyprowadzono przezskórnie w okolicy potylicznej szczura. Cewnik przepłukano roztworem soli fizjologicznej i heparyny. Mięśnie i skórę zaszyto, a wolny koniec cewnika zabezpieczono silikonowym klejem. Dalsze postępowanie ze szczurem po przeprowadzeniu operacji opisano w poprzednim rozdziale.



Ryc. 8 Schemat cewnika wprowadzanego do żyły szyjnej zewnętrznej.

1.2.2.2. Test cofania ogona

Efekt przeciwbólowy mierzono w teście cofania ogona wykorzystując aparat do mierzenia analgezji typ 336 (firmy IITC INC. USA), w którym jako bodziec bólowy stosowano bodziec termiczny w postaci wiązki światła (Yoburn i wsp., 1984) (Ryc. 9).



Ryc. 9 Pomiar progu bólowego w teście cofania ogona.

Temperatura wiązki tak była dobrana aby czas reakcji zwierząt przed podaniem związku nie przekraczał 2-2,5 sekund. Maksymalny czas drażnienia ogona wynosił dla związków podawanych intratekalnie 7 sekund dla dożylnych 10 sekund, tak aby przedłużona ekspozycja nie powodowała oparzeń ogona. Próg bólowy badano przed podaniem oraz w 5, 15, 30, 60, 120 min po podaniu badanych związków. Dla każdego przedziału czasowego wykonywano trzy pomiary. Stopień analgezji wyliczono jako procent maksymalnego możliwego efektu (% Maximal Possible Effect) obliczony według wzoru (Brady i Holtzman 1982):

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

% M P E - (% Maximal Possible Effect)

% maksymalnego możliwego efektu

T_0 - czas reakcji przed podaniem związku

$T_{(5-120)}$ - czas reakcji po podaniu w odpowiednim przedziale czasowym

T_d - stała czasowa 7 lub 10

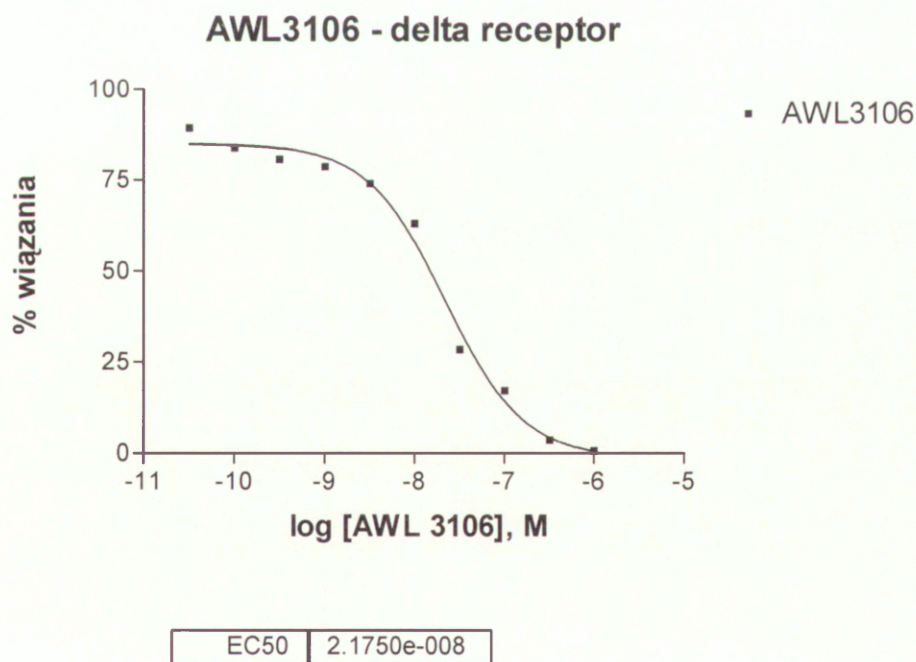
Z uzyskanych wyników obliczono średnie wartości % MPE dla poszczególnych jednostek czasowych. Wartości liczbowe podano jako średnią w grupie uwzględniając odchylenie standardowe. Wyniki poddano analizie statystycznej korzystając z testu t-studenta, porównując dwie grupy względem siebie. Jeżeli porównywano więcej niż dwie grupy, przeprowadzono analizę wariancji, wykorzystując test ANOVA. Różnice w wartościach uznano za istotne statystycznie dla wartości $p < 0,05$ i $p < 0,001$. Do wykonania obliczeń statystycznych użyto programów komputerowych Microsoft Office 2000 lub Statistica 7.1.

2. Wyniki badań

2.1. Wiązanie peptydu AWL3106 do receptorów opioidowych typu δ i μ

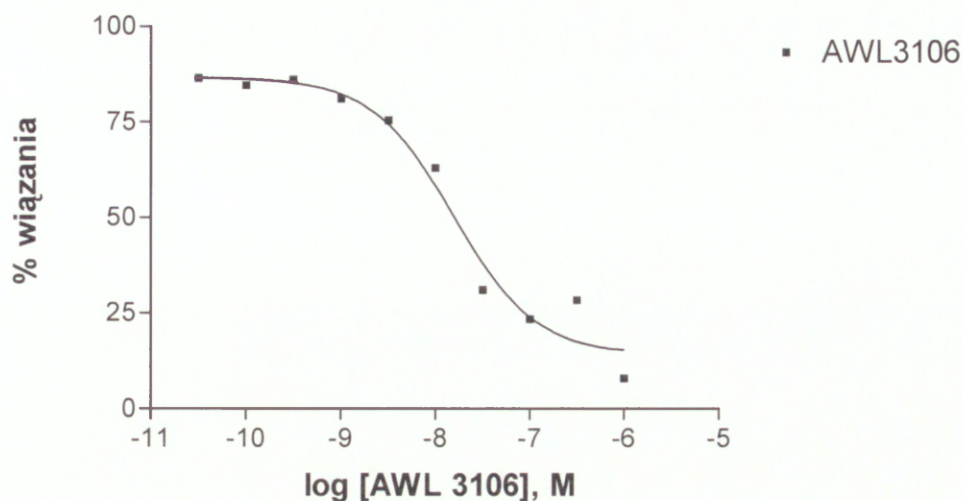
Badanie powinowactwa receptorowego peptydu AWL3106 do receptorów opioidowych typu δ w obecności znakowanego ligandu o właściwościach agonistycznych do tego receptora wykazały, że wartość IC_{50} wynosi $21,75 \pm 5,55$ (Ryc. 10).

Badanie powinowactwa receptorowego peptydu AWL3106 do receptorów opioidowych typu μ w obecności znakowanego ligandu o właściwościach agonistycznych do tego receptora wykazały, że wartość IC_{50} wynosi $15,52 \pm 5,31$ (Ryc. 11).



Ryc. 10 Wiązanie peptydu AWL3106 do receptorów opioidowych typu delta w obecności [3 H]Deltorfiny.

AWL3106 - mu receptor



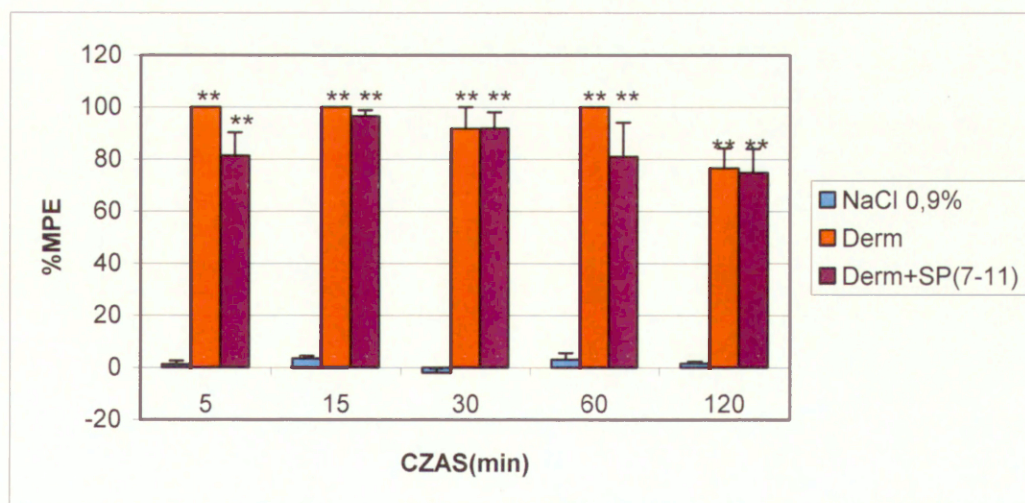
Ryc. 11 Wiązanie peptydu AWL3106 do receptorów opioidowych typu mu w obecności $i[{}^3H]DAMGO$.

2.2. Działanie antynocyceptywne peptydu AWL3106 po podaniu podpajęczynówkowym (*i.t.*) w teście cofania ogona

W podrozdziale „Podstawy konstrukcji związków hybrydowych” opisano wcześniejsze prace badawcze dotyczące mechanizmów działania opioidów i substancji P. Charakterystyka tych dwóch grup agonistów receptorowych stanowiła punkt wyjścia przy konstruowaniu związku hybrydowego AWL3106 łączącego w swojej budowie dermorfinę i SP. W tym podrozdziale zostaną opisane wzajemne oddziaływania komponent budujących związek hybrydowy AWL3106 czyli dermorfiny i C-terminalnego fragmentu SP(7-11) podanych łącznie i oddzielnie. Sprawdzono na ile SP(7-11) może determinować efekt analgetyczny dermorfiny i czy osiągnięty efekt zależy od działania na podobnym poziomie molarnym, oraz określono jak wtedy zmienia się stan równowagi dynamicznej w efekcie czego dochodzi do działania synergicznego lub hamującego. Podanie podpajęczynówkowe pozwala obserwować efekt analgetyczny wywołany bezpośrednim

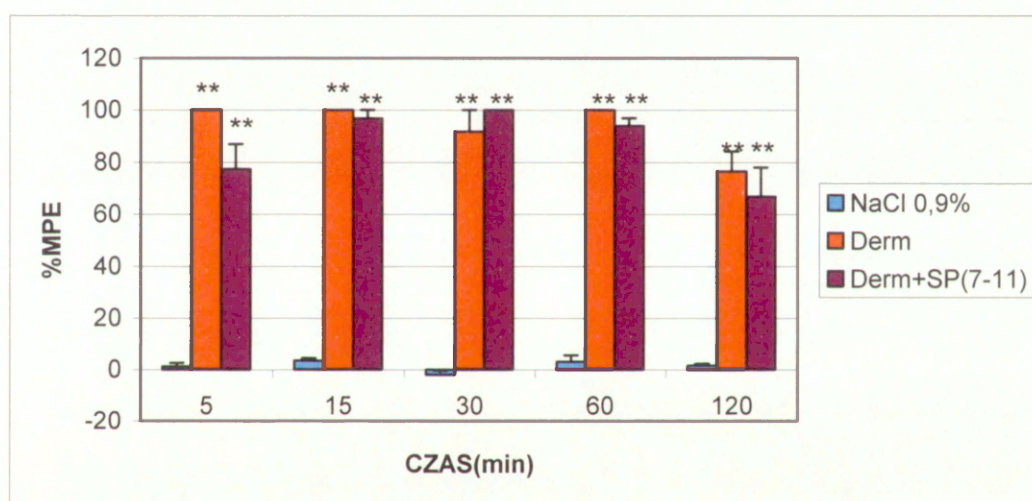
działaniem tych substancji nie zakłócony innymi czynnikami jak przy podaniu obwodowym.

Badania rozpoczęto od podania podpajęczynówkowo dermorfiny w dawce 0,1 nmol. Stosowanie wyższych dawek uniemożliwiłoby obserwowanie zmian efektu analgetycznego pod wpływem C-terminalnego końca SP(7-11). W tej dawce maksymalny efekt analgetyczny nie utrzymywał się na maksymalnym poziomie przez 120 min ale trwał przez pierwsze 15 min, następnie w 30 min nieznacznie spadł do wartości 91,78 % MPE, w 60 min ponownie osiągnął wartość maksymalną, tak by w 120 min sięgnąć wartości 76,47 % MPE (Ryc. 12). Przy takim rozkładzie wartości % MPE dla dermorfiny podanie N-terminalnego fragmentu SP(7-11) w dawce równoważnej molarnie pozwoliło zaobserwować w działaniu przeciwbólowym zmiany, które kształtowały się następująco: w 5 min efekt antynocyceptywny spadł o 18,7 % MPE w porównaniu z grupą kontrolną (czysta dermorfina), następnie w 15 min był zbliżony do wartości maksymalnej efektu 96,56 % MPE, w 30 min był identyczny z czystą dermorfina osiągając wartość 91,86 % MPE i kolejno malal przez wartości 80,99 % MPE w 60 min i 74 % MPE w 120 min. Ta wartość również była zbliżona do wartości czystej dermorfiny, która w tym punkcie wynosiła 76,4 7 % MPE (Ryc. 12).



Ryc. 12 Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym dermorfiny w dawce 0,1 nmol, oraz dermorfiny łącznie z SP(7-11) w dawce 0,1 nmol Derm + 0,1 nmol SP(7-11) w porównaniu z grupą kontrolną. ** $p < 0,001$.

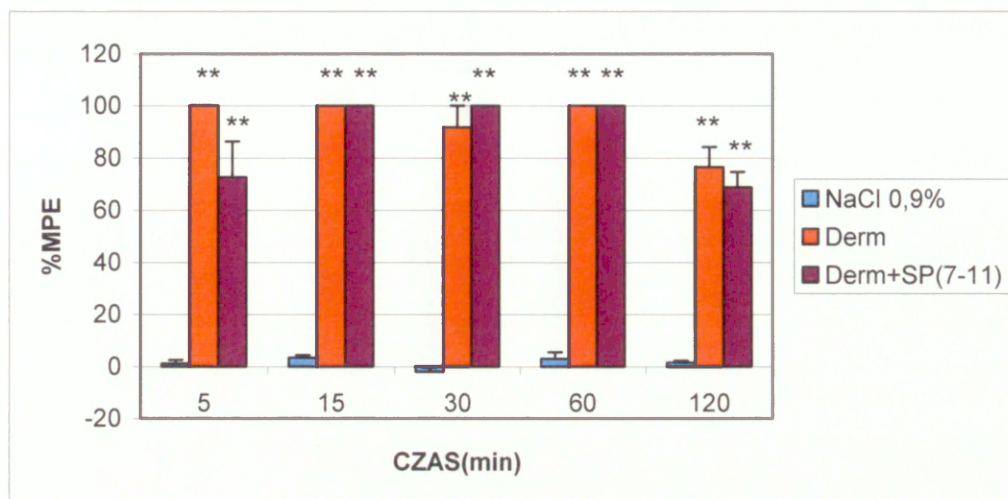
Dla określenia wzajemnych relacji dermorfina, a SP(7-11) kolejnej grupie szczurów podano dermorfine w takim samym stężeniu jak w poprzednim eksperymencie, ale dawka SP(7-11) była 10 razy niższa i wynosiła 0,01 nmol. W porównaniu do poprzedniego eksperymentu efekt analgetyczny lekko spadł w 5 min do wartości 77,33 % MPE, następnie w 15 min był identyczny jak w 15 min przy dawce SP(7-11) 10 razy większej, w 30 min osiągnął wartość maksymalną, w 60 min wartość 93,98 % MPE co jest wartością wyższą porównując z odpowiednim przedziałem czasowym dla dawki 0,1 nmol SP(5-11). W 120 min testu wartość % MPE wyniosła 66,88 (Ryc. 13).



Ryc. 13 *Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym dermorfiny w dawce 0,1 nmol, oraz dermorfiny łącznie z SP(7-11) w dawce 0,1 nmol Derm + 0,01 nmol SP(7-11) w porównaniu z grupą kontrolną, **p<0,001.*

Ostatnią badaną dawką SP(7-11), która mogłaby wpłynąć na efekt analgetyczny dermorfiny była dawka 0,001 nmol. Zaobserwowano, że SP(7-11) w 5 min testu cofania ogona obniżyła efekt analgetyczny dermorfiny do wartości 72,65 % MPE w porównaniu z czystą dermorfina, natomiast w 15 i 60 min nie miała wpływu na ten efekt lub efekt został przykryty przez działania dermorfiny ponieważ zmierzono 100 % MPE dla tych przedziałów czasowych. W 30 min wartość ta osiągnęła 100 % MPE, co było o 8,2 % MPE więcej niż w odpowiednim przedziale czasowym dla czystej dermorfiny.

Efekt w 120 min był z kolei o 7,7 % MPE niższy w porównaniu z czystą dermorfina (Ryc. 14).

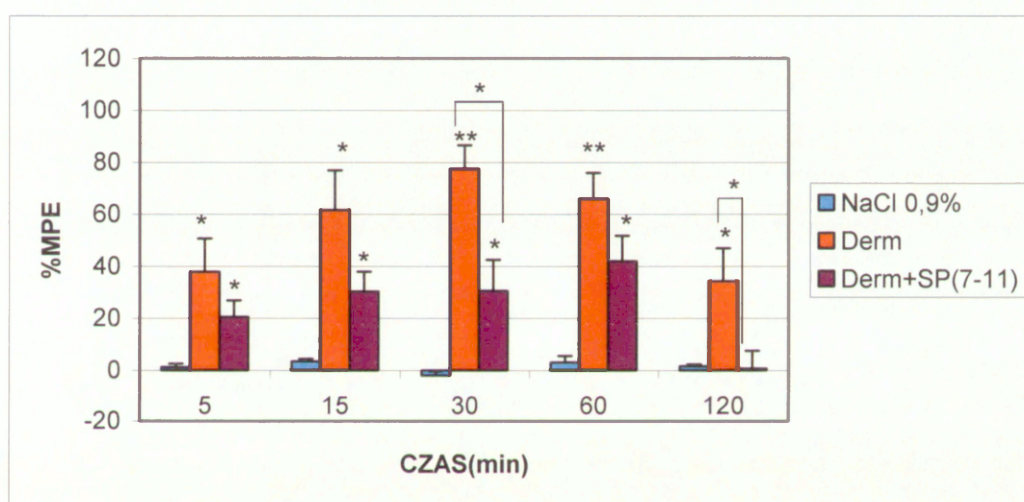


Ryc. 14 *Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym dermorfiny w dawce 0,1 nmol, oraz dermorfiny łącznie z SP(7-11) w dawce 0,1 nmol Derm + 0,001 SP(7-11) nmol w porównaniu z grupą kontrolną, ** $p < 0,001$.*

Trzy poprzednio opisane eksperymenty pokazały, że różne dawki SP(7-11) mogą zmieniać efekt analgetyczny dermorfiny. Przedstawiono, że pośrednie dawki SP(7-11) mogą wzmocnić działanie dermorfiny w porównaniu z dawką wyższą i niższą SP(7-11). Opisywane działanie analgetyczne odbywało się na wysokim poziomie działania dermorfiny, dlatego też przy takim dawkowaniu trudno jest stwierdzić czy efekt analgetyczny przy pośrednim dawkowaniu i niższym wynika z właściwości modulujących SP(7-11) czy z przykrycia efektu pronocyceptywnego przez silne działanie dermorfiny. Dla rozstrzygnięcia tego zagadnienia podano zdecydowanie niższą dawkę dermorfiny przy jednoczesnym zachowaniu dawek SP(7-11) z poprzedniego eksperymentu.

Rozkład efektu analgetycznego dermorfiny przy dawce 0,01 nmol przypominał działanie analgetyku jakim jest np. morfina. Efekt stopniowo narastał od wartości 37,81 % MPE w 5 min testu, swój szczyt osiągnął w 30 min przy wartości 77,39 % MPE, następnie spadał do wartości 34,26 % MPE w 120 min. Przy takim rozkładzie wartości % MPE dla czystej dermorfiny,

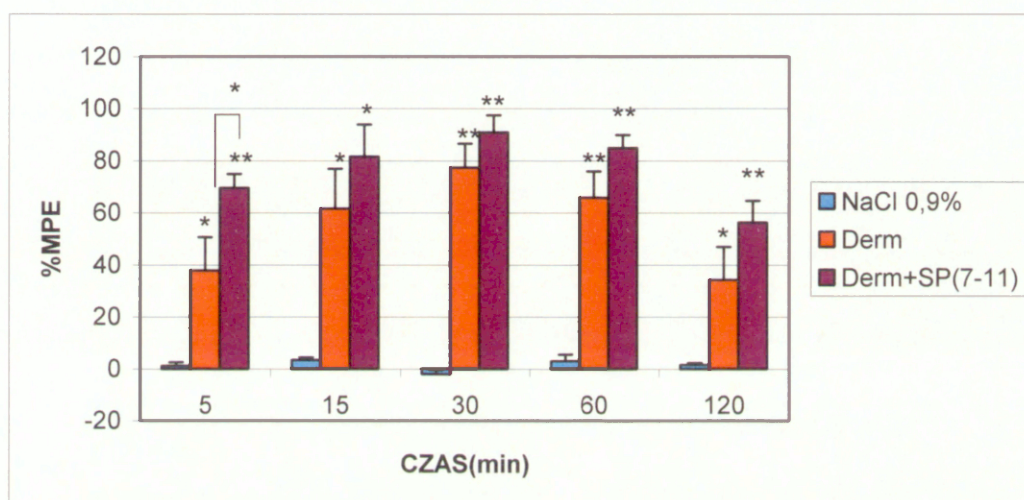
możliwe było zaobserwowanie zmian działania antynocyceptywnego pod wpływem różnych dawek SP(7-11). Pierwszą badaną dawką SP(7-11) była dawka 0,1 nmol. Zaobserwowano, że efekt działania dermorfiny został zdecydowanie ograniczony. Do 30 min po podaniu nie przekroczył 30,59 % MPE co było o 47 jednostek MPE mniej niż dla analogicznego okresu dla działania czystej dermorfiny. Efekt lekko wzrósł w 60 min, ale i tak był on o 24 jednostki niższy niż w porównywalnym okresie, a następnie spadł do wartości 0,69 % MPE co w praktyce oznacza, że w 120 min jego działanie całkowicie ustało (Ryc. 15)



Ryc. 15 *Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym dermorfiny w dawce 0,01 nmol, oraz dermorfiny łącznie z SP(7-11) w dawce 0,01 nmol Derm + 0,1 nmol SP(7-11) w porównaniu z grupą kontrolną, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.*

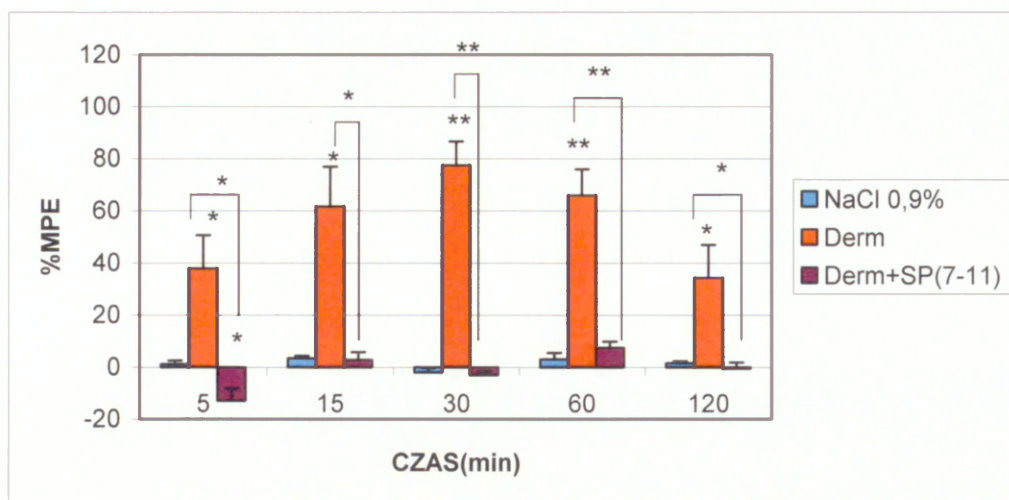
Zdecydowanie inny poziom analgezji zaobserwowano gdy podano łącznie dermorfinę z SP(7-11) w równoważnych dawkach. Rozkład efektu przypominał typowy rozkład działania innych analgetyków jak morfiny, czyli kształt dzwonu z maksymalnym efektem w 30 min. Szczegółowy opis wartości MPE w przedziałach czasowych wyglądał następująco: w 5 min 69,63 %, w 15 min 30,34 %, w 30 min 81,65 %, w 60 min 84,95 % i w 120 min 56,32 %. Porównując powyższe wartości z wartościami czystej dermorfiny można było zauważyć, że SP(7-11) w dawce 0,01 nmol powoduje

wzmocnienie efektu działania czystej dermorfiny. Efekt ten wyraźnie zaznacza się już w 5 min od podania mieszaniny dermorfiny z SP(7-11) i utrzymuje się do 120 min. Różnica w jednostkach % MPE pomiędzy dermorfina a mieszaniną dermorfiny i SP(7-11) dla poszczególnych przedziałów czasowych przedstawia się następująco: w 5 min jest to 32 jednostki, w 15 min 20, w 30 min 13,4, w 60 min 19, a w 120 min 22 (Ryc. 16).



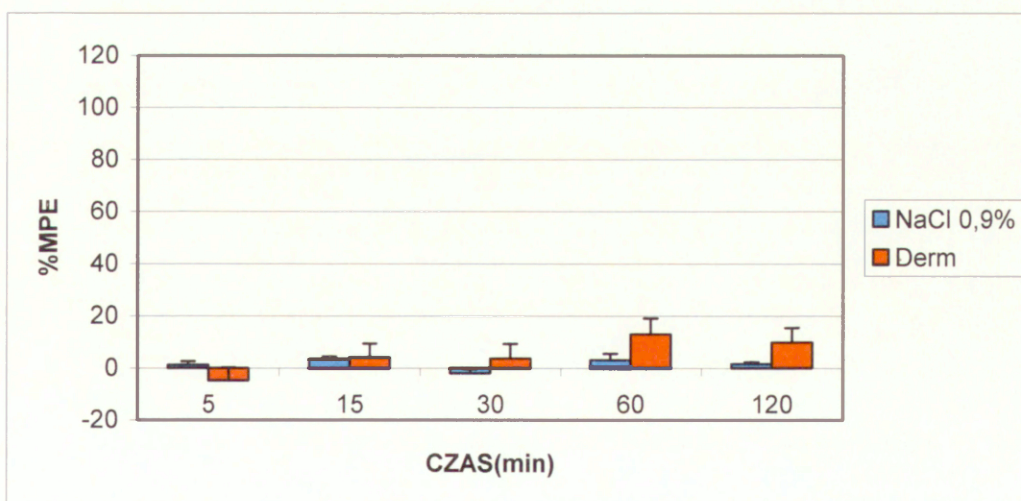
Ryc. 16 *Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym dermorfiny w dawce 0,01 nmol, oraz dermorfiny łącznie z SP(7-11) w dawce 0,01 nmol Derm + 0,01 nmol SP(7-11) w porównaniu z grupą kontrolną, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.*

Zdecydowanie inny efekt osiągnięto kiedy podano minimalną dawkę SP(7-11) tzn. 0,001nmol. C-terminalny fragment SP przesunął stan równowagi pomiędzy tymi dwoma komponentami w kierunku działania pronocyceptywnego, typowego dla SP. Tym bardziej jest to zaskakujące, że dziesięć razy wyższa dawka dermorfiny nie przykryła efektu działania SP(7-11). Obserwowane zwierzęta wykazywały objawy typowe jak po zastosowania czystego SP takie jak: przeczulenie na dotyk, drapanie, gryzienie. Dokładniejsza analiza wartości % MPE przedstawiała się następująco 5 min testu 13 %, 15 min 2,8 %, 30 min 3 %, 60 min 7,6 %, 120 min 0,6 % (Ryc. 17).



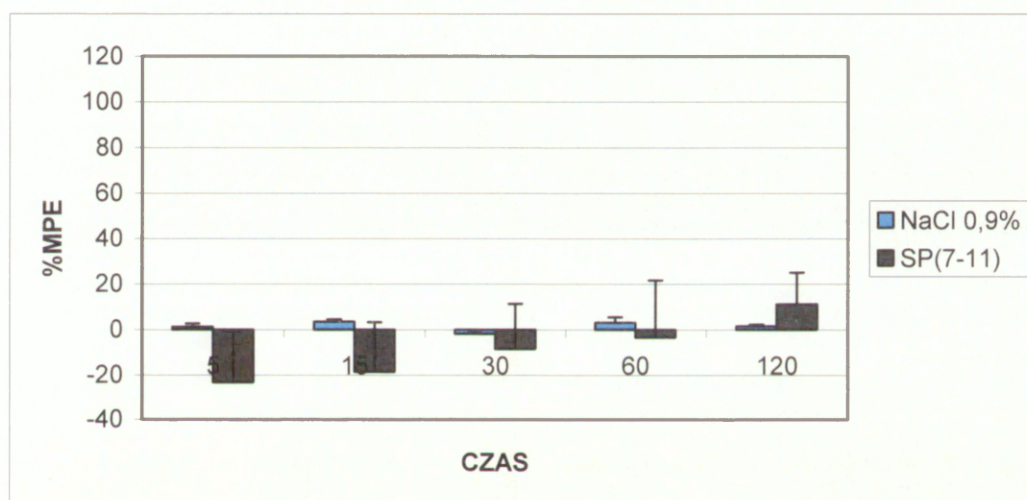
Ryc. 17 Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym dermorfiny w dawce 0,01 nmol, oraz dermorfiny łącznie z SP(7-11) w dawce 0,01 nmol Derm + 0,001 nmol SP(7-11) w porównaniu z grupą kontrolną, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Przeprowadzono jeszcze badania progu bólowego dla dermorfiny w dawce 0,001 nmol. Okazało się jednak, że przy tej dawce efekt analgetyczny zbliżony jest do działania soli fizjologicznej, a w maksymalnym punkcie uchwytu wynosi zaledwie 13 % MPE, dlatego też zrezygnowano z łącznego podania dermorfiny z SP(7-11) (Ryc. 18).



Ryc. 18 Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym dermorfiny w dawce 0,001 nmol, w porównaniu z grupą kontrolną.

Ostatnim etapem testu badającego wzajemne relacje dermorfiny z SP(7-11) było określenie jak sam C-terminalny koniec SP może modulować zachowanie i efekt analgetyczny szczurów. Dawka 0,1 nmola działała na szczury pronocyceptywnie. Zaobserwowano intensywne czerwone (ceglaste) zabarwienie ogona, kończyn i uszu, nastroszenie sierści, popiskiwanie. Pomimo, że nie zaobserwowano istotności statystycznej pomiędzy tą dawką SP(7-11), a solą fizjologiczną to porównując % MPE w kolejnych przedziałach czasowych zaobserwowano, że wartości te stale wzrastały od wartości -23,3, poprzez -18,6, -8,6, -3,5, do 11,2 (Ryc. 19).

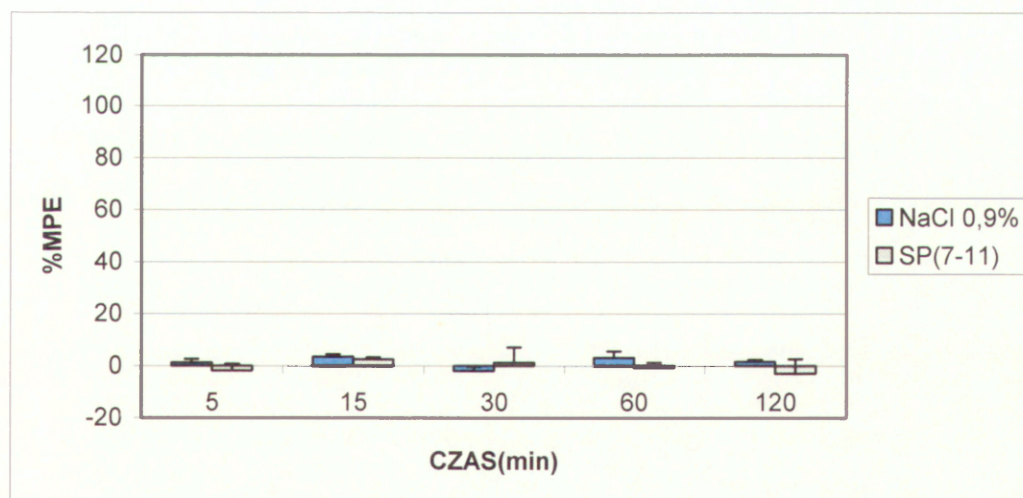


Ryc. 19 *Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym SP(7-11) w dawce 0,1 nmol, w porównaniu z grupą kontrolną.*

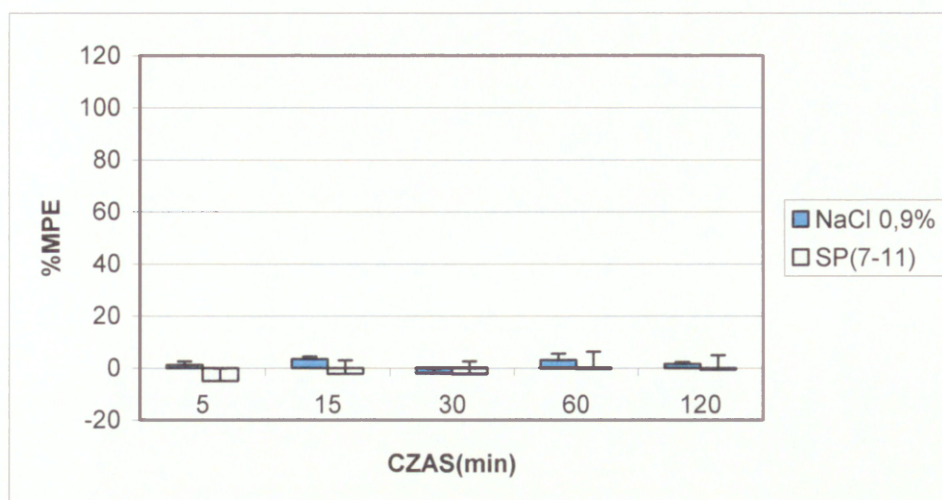
Dla kolejnych, niższych dawek tzn. 0,01 nmola i 0,001 nmola SP(7-11) nie zaobserwowano wcześniej opisanych zachowań. Efekt analgetyczny w obu przypadkach zbliżony był do zera, nie zaobserwowano istotności statystycznej pomiędzy efektem działania soli fizjologicznej, a SP(7-11). Jednak analizując wyniki poszczególnych osobników w grupach 0,01 nmola i 0,001 nmola można było zauważyć, że dawka 0,001 nmola działa silniej pronocyceptywnie niż 0,01 nmola (Tab. 9, Ryc. 20 i 21).

Tab. 7 Szczegółowa analiza efektu analgetycznego u szczurów w poszczególnych przedziałach czasowych dla dawki SP(7-11) 0,01 nmol i 0,001 nmol.

dawka	0,01 nmol					0,001 nmol					
Nr szczura	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6
Czas (min)	% MPE										
5	-8,6	3,2	-8,1	3,6	0,0	-17,5	-6	-20,5	0,0	10,2	3,4
15	2,2	2,6	4,8	0,0	2,5	-11,9	-9,7	-17,3	1,9	11,4	12,2
30	-6,5	7,1	-16,9	16,1	6,3	-15,9	-10,4	-10	-1,3	12,5	11,5
60	-5,8	1,9	-1,6	4,4	-1,9	-18,3	-16,4	-4,7	3,2	23,3	10,8
120	-12,9	1,9	-19,4	9,5	5,6	-23	-4,5	-7,9	9,7	12,5	8,8



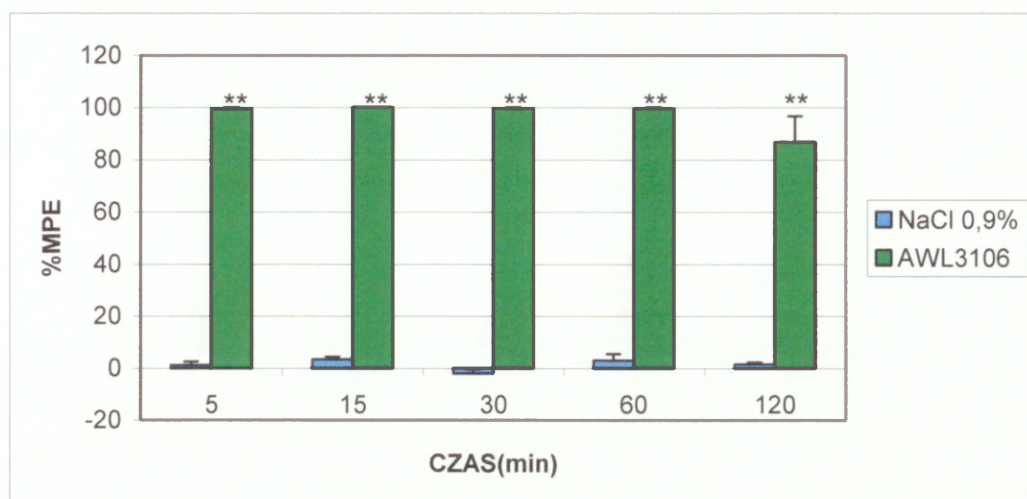
Ryc. 20 Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym SP(7-11) w dawce 0,01 nmol, w porównaniu z grupą kontrolną.



Ryc. 21 Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym SP(7-11) w dawce 0,001nmol, w porównaniu z grupą kontrolną.

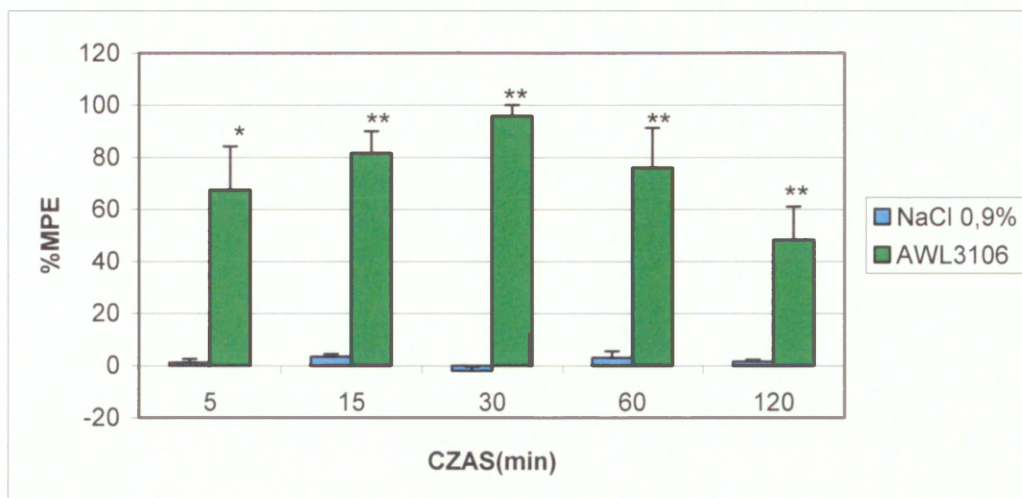
W opisanej wyżej części badań ekperymentalnych pokazano jak dermorfina i SP(7-11) mogą na siebie oddziaływać i jakie wzajemne proporcje są istotne dla osiągnięcia najwyższego efektu analgetycznego. Kolejnym etapem było zastosowanie właściwego, badanego związku hybrydowego AWL3106 po podaniu podpajęczynówkowym i opisanie jak trwałe połączenie Derm i SP(7-11) w jeden związek może stymulować działanie przeciwbólne.

Po podaniu podpajęczynówkowym zaobserwowano wyraźne działanie antynocyceptywne peptydu AWL3106 zależne od wielkości podanej dawki. Pomiar analgezji rozpoczęto dawkami 1-2 nmol *i.t.* i zmierzono analgezię, w teście cofania ogona utrzymującą się od 5 min do 120 min, na maksymalnym poziomie. Dawka ta jednak okazała się za wysoka przy podaniu podpajęczynówkowym. Zaobserwowano pewne efekty neurofizjologiczne, które wskazywały na przedawkowanie substancji. Najważniejsze z nich to: zasinione uszy, kończyny tylne wyprostowane, intensywne łzawienie i ślinotok, depresja układu oddechowego. Dlatego też do kolejnych badań zdecydowano się użyć mniejszych dawek, przy których nie obserwowano objawów niepożądanych. W równej dawce 0,5 nmol *i.t.* peptyd powodował maksymalny analgetyczny efekt trwający do 60 min prowadzonego testu z lekkim obniżeniem do wartości 86,67 % MPE w 120 min (Ryc. 22)

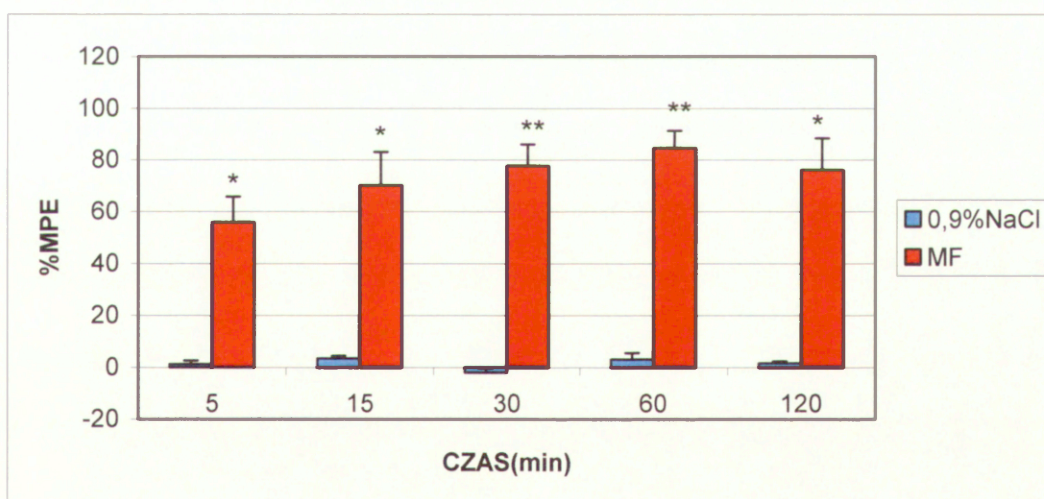


Ryc. 22 Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym peptydu AWL3106 w dawce 0,5 nmol w porównaniu z grupą kontrolną, ** $p < 0,001$.

Zmniejszanie dawki badanego peptydu owocowało zmianą kształtu profilu analgetycznego działania AWL3106 z maksymalnym uchwycem w 30 min od momentu podania, kształtu przypominającego dzwon, który jest typowy dla działania analgetyków jakim jest np. morfina (Ryc. 23). AWL3106 w dawce 0,1 nmol *i.t.* w 5 min od podania osiągał wartość 67,34 % MPE, efekt ten narastał do 30 min by osiągnąć wartość 95,75 % MPE i spadł do wartości 48,11 % MPE w 120 min (Ryc. 23). Dla porównania podobny efekt analgetyczny jak AWL3106 w dawce 0,1 nmol morfina osiągnęła w dawce 3 nmola *i.t.* gdzie maksymalny punkt uchwytu osiągnęła w 60 min testu przy wartości 84,4 % MPE (Ryc. 24)



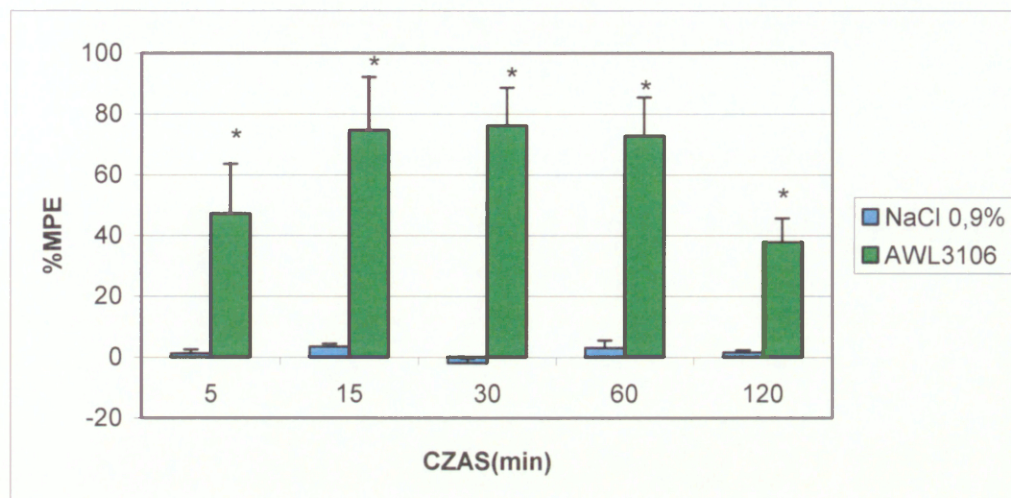
Ryc. 23 Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym peptydu AWL3106 w dawce 0,1 nmol w porównaniu z grupą kontrolną, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.



Ryc. 24 Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym morfiny (MF) w dawce 3 nmol w porównaniu z grupą kontrolną, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

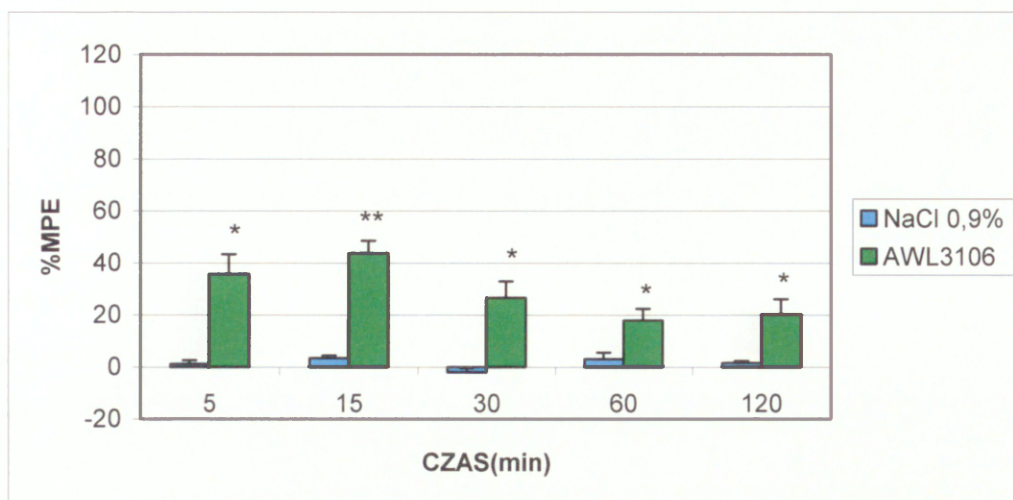
Dalsze zmniejszanie dawki powodowało wyraźne zmniejszenie efektu analgetycznego. Przy dawce 0,025 nmol *i.t.* obserwowano narastanie tego efektu od 5 min i wartości 47,1 % MPE przez 15 min, 30 min i 60 min gdzie utrzymywał się na podobnym poziomie przy wartościach 74,67 % MPE,

76,09 % MPE, 72,73 % MPE, tak by zakończyć test wartością 37,8 % MPE w 120 min (Ryc. 25).



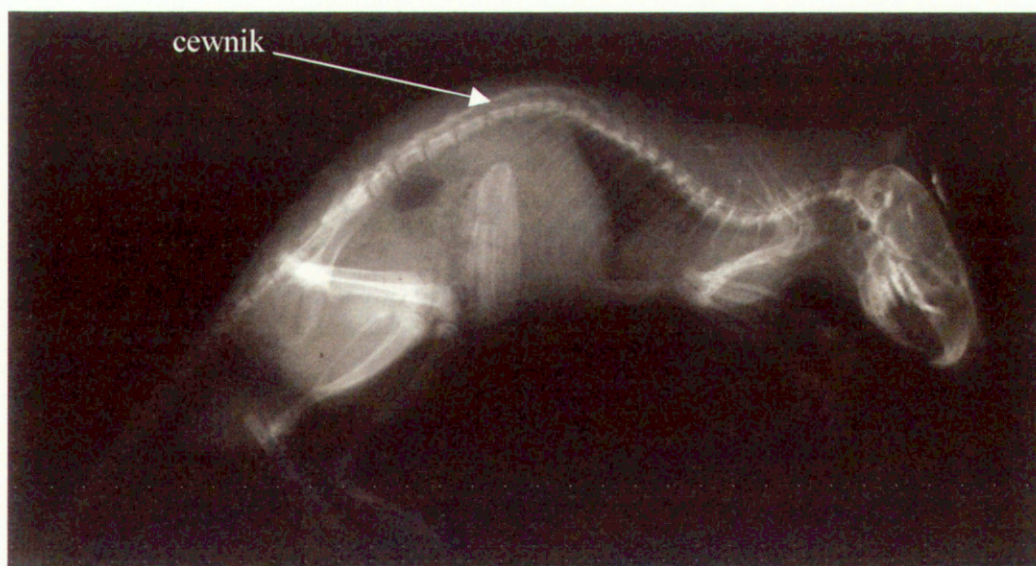
Ryc. 25 Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym AWL3106 w dawce 0,025 nmol w porównaniu z grupą kontrolną, * $p < 0,05$.

Kolejną badaną dawką peptydu AWL3106 w teście cofania ogona była dawka 0,01 nmol *i.t.*. Profil działania antynocyceptywnego na bodziec świetlny stosowany w teście przypominał ten przy dawce 0,1 nmol, 0,05 nmol (dane nie prezentowane), czy 0,25 nmol, natomiast zmieniły się odpowiednio i były niższe w przedziałach czasowych wartości % MPE. Zaobserwowano typowy efekt dawkozależny: wraz ze spadkiem dawki spadała analgezyja, która nie przekroczyła wartości 43,58 % MPE w 15min testu (Ryc. 26). Dalsze zmniejszanie dawki nie dawało obserwowanego efektu antynocyceptywnego.



Ryc. 26 Efekt analgetyczny po podaniu podpajęczynówkowym AWL3106 w dawce 0,01 nmol w porównaniu z grupą kontrolną, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Po zakończeniu eksperymentów badania bólu ostrego w teście cofania ogona wykonano RTG losowo wybranych szczurów dla określenia ułożenia cewnika w przestrzeni podpajęczynówkowej (Ryc. 27).

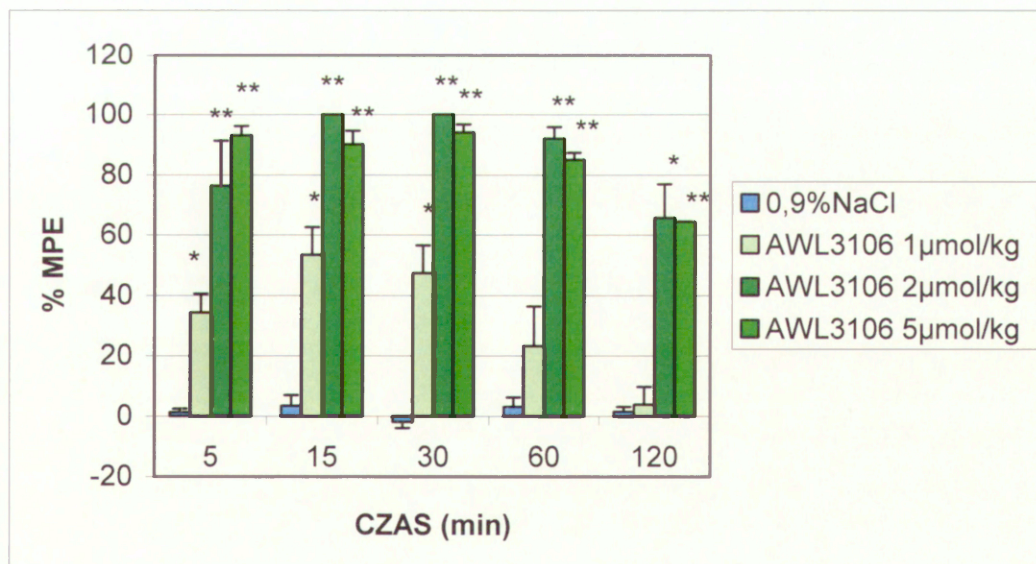


Ryc. 27 RTG szczura z zainplantowanym cewnikiem do przestrzeni podpajęczynówkowej.

2.3. Działanie antynocyceptywne peptydu AWL3106 po podaniu dożylnym (*i.v.*) w teście cofania ogona

Po podaniu dożylnym związku hybrydowego AWL3106 obserwowano wyraźne działanie antynocyceptywne peptydu, który podano w trzech porcjach: 1 $\mu\text{mol/kg}$, 2 $\mu\text{mol/kg}$, 5 $\mu\text{mol/kg}$. Porcje peptydu zostały tak dobrane aby można było obserwować wzrost potencjału analgetycznego zależny od dawki w odniesieniu do efektu analgetycznego morfiny (MF). W zastosowanym przedziale dawek nie obserwowano efektu toksycznego działania AWL3106.

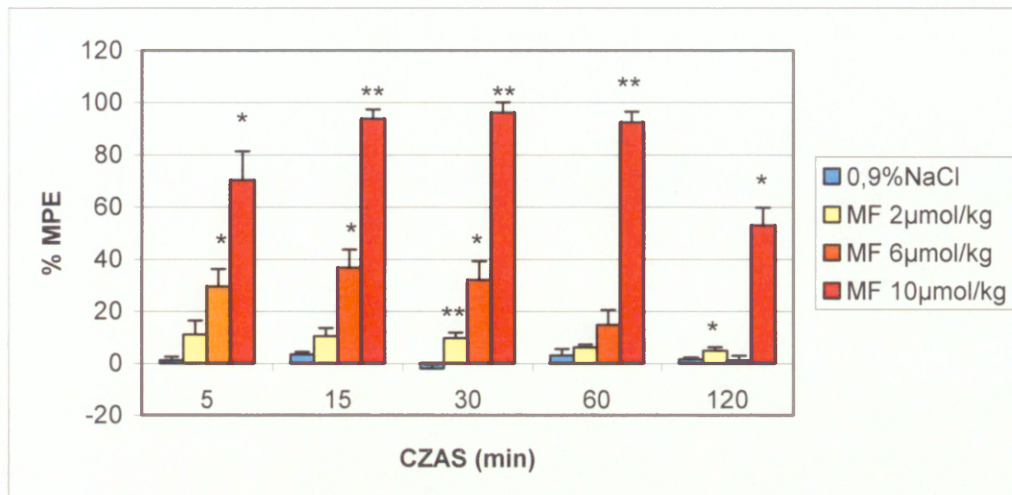
Efekt analgetyczny AWL3106 w dawce 1 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.* narastał od wartości 34,33 % MPE w 5 min, osiągał swoje maksimum w 15 min wartością 53,4 % MPE by następnie maleć aż do wartości 3,83 % MPE osiągniętej w 120 min (Ryc. 28).



Ryc. 28 Efekt analgetyczny po podaniu dożylnym 1 $\mu\text{mol/kg}$, 2 $\mu\text{mol/kg}$, 3 $\mu\text{mol/kg}$ peptydu AWL3106 w porównaniu z grupą kontrolną, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Podanie morfiny rozpoczęto od dawki 2 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.* ponieważ niższe dawki nie wywoływały efektu analgetycznego. W tej dawce efekt

analgetyczny wynosił 11,1 % MPE, 10,48 % MPE 9,75 % MPE dla kolejnych przedziałów czasowych tzn. dla 5-15-30 min by spaść do wartości 4,92 % w 120 min (Ryc. 29).



Ryc. 29 Efekt analgetyczny po podaniu dożylnym 2 $\mu\text{mol/kg}$, 6 $\mu\text{mol/kg}$, 10 $\mu\text{mol/kg}$ morfiny (MF) w porównaniu z grupą kontrolną, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Zwiększenie dwukrotne dawki peptydu AWL3106 do 2 $\mu\text{mol/kg}$ zaowocowało osiągnięciem maksymalnego efektu analgetycznego u wszystkich szczurów w badanej grupie w przedziale czasowym 15-30 min. W 5 min tylko dwa badane szczury wykazały efekt analgetyczny na poziomie 29 % MPE, pozostałe wykazały 100 % MPE. Efekt analgetyczny spadał od 60 min i wartości 92 % MPE, do wartości 65,67 % MPE w 120 min (Ryc. 28).

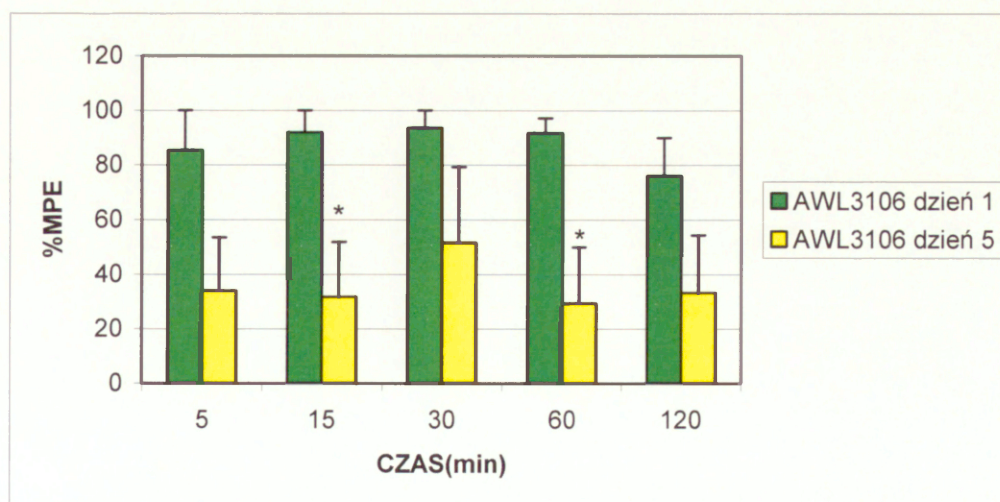
Morfina w dawce 6 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.* wykazywała podobny potencjał analgetyczny jak AWL3106 w dawce 3 razy mniejszej i rósł on od wartości 29,58 % MPE w 5 min do wartości 36,78 % MPE w 15 min, utrzymywał się na podobnym poziomie tzn. 32,08 % MPE do 60 min od momentu podania i spadł do wartości 2,01 % MPE w 120 min (Ryc. 29).

Zwiększenie dawki peptydu AWL3106 do 5 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.* nie spowodowało wyraźnej zmiany w profilu analgetycznym w odniesieniu do dawki 2 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.* Zaobserwowano, że w przedziale dawek 2-5 $\mu\text{mol/kg}$ AWL3106 osiąga swój efekt pułapowy i zwiększenie ilości peptydu nie powoduje wzrostu % MPE, natomiast następuje pewien rozrzut wartości

% MPE u poszczególnych szczurów w grupie badanej, a mianowicie zaobserwowano osobniki u których efekt analgetyczny wynosił w 5 min, 15 min i 30 min 100 % MPE i i takie u których nie osiągał on maksymalnego progu. Średnia wartość % MPE w 5 min wynosiła 93,1 jednostki, wartość ta utrzymywała się na podobnym poziomie w 15 min i 30 min osiągając 90,15 i 94,1 następnie spadała w 60 min do wartości 85 % MPE i w 120 min do 64,35 % MPE (Ryc. 28).

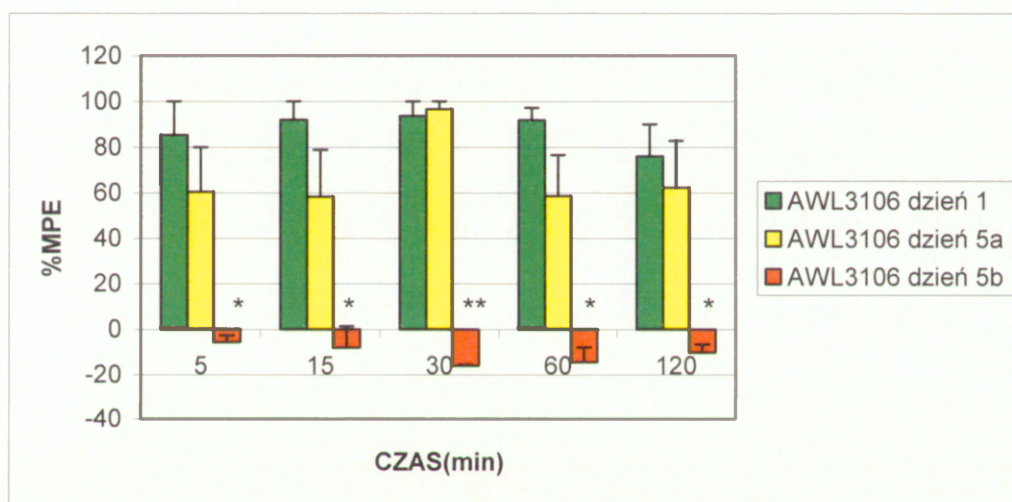
Zwiększenie dawki morfiny do 10 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.* wywołało porównywalny efekt analgetyczny jak peptyd AWL3106 w dawce 2 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.*. Efekt ten w kolejnych przedziałach czasowych przedstawiał się następująco: w 5 min 70,38 % MPE, w 15 min 93,75 % MPE, w 30 min 70,38 % MPE i 53,03 % MPE w 120 min (Ryc. 29).

Następnym etapem badań było opisanie efektu tolerancji jaki mógłby powstać w następstwie podawania związku hybrydowego *i.v.* przez pięć kolejnych dni. Stwierdzono, że w kolejnych przedziałach czasowych różnica pomiędzy dniem początkowym, a dniem zakończenia pomiaru tolerancji wynosiła średnio 50 jednostek % MPE, zmieniając się kolejno w 5 min i wartości 85,4 % MPE w dniu zerowym do wartości 33,97 % MPE w piątym dniu podania oraz kolejno w 15 min z 91,96 % MPE do 31,74 % MPE, w 30 min z 93,66 % MPE do 51,56 %, w 60 min z 91,78 % do 29,36 % MPE i 120 min z 76 % MPE do 33,26 % MPE (Ryc. 30).



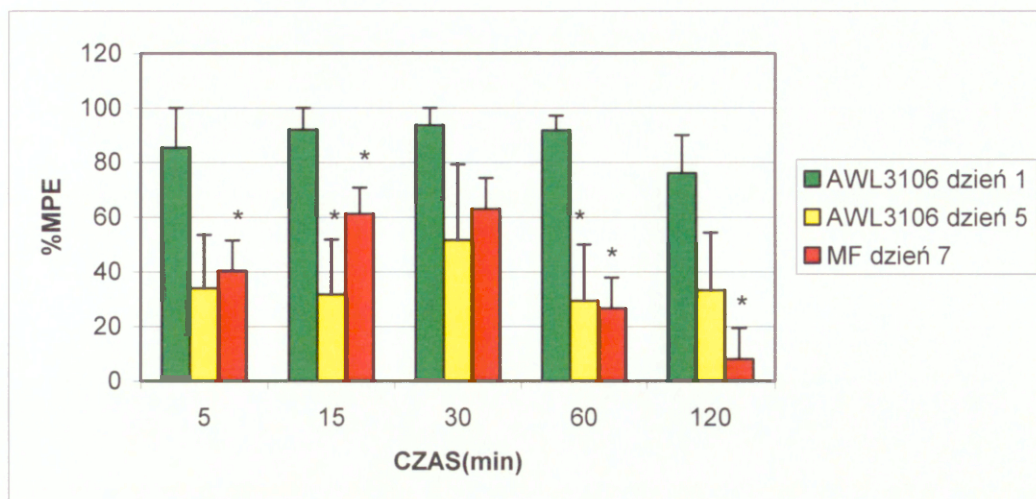
Ryc. 30 *Rozwój tolerancji peptydu AWL3106 podanego dożylnie w dawce 5 $\mu\text{mol/kg}$, * $p < 0,05$.*

Porównując efekt analgetyczny u poszczególnych osobników w grupie na których sprawdzano efekt rozwoju tolerancji zauważono, że są osobniki u których mimo podawania peptydu przez kolejne dni obserwowano wyraźny efekt analgetyczny wzrastający od wartości 60,45 % MPE w 5 min i osiągający szczyt w 30 min i poziom 96,67 % MPE, tak by następnie maleć do wartości 62,3 % MPE w 120 min (Ryc. 31). Jednocześnie obserwowano w grupie osobniki wykazujące takie zachowania jak: drapanie, gryzienie, przeczulenie na dotyk. Nie obserwowano efektu analgetycznego u tych osobników (Ryc. 31).



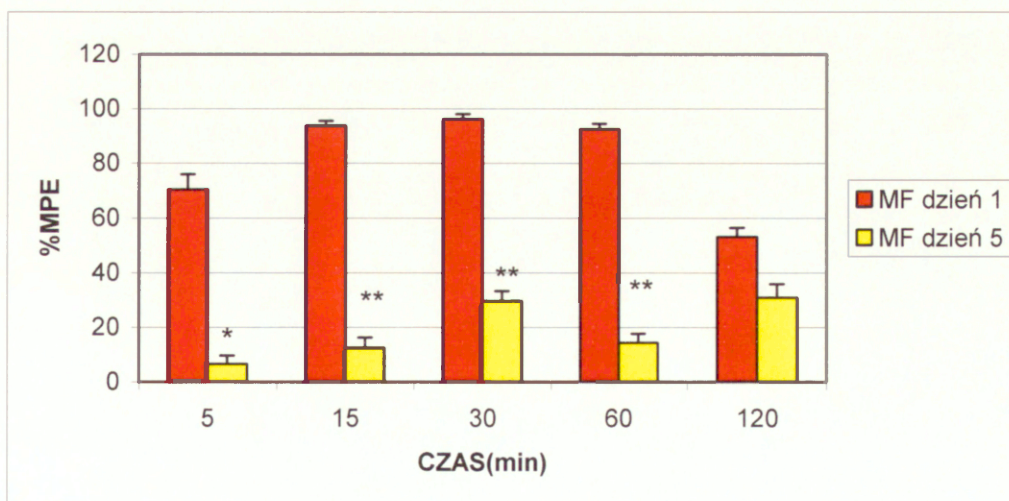
Ryc. 31 *Rozwój tolerancji peptydu AWL3106 podanego dożylnie w dawce 5 $\mu\text{mol/kg}$ z uwzględnieniem efektu analgetycznego (słupki 5a) i hiperalgezji (słupki 5b), * $p<0,05$, ** $p<0,001$.*

Dla odróżnienia hiperalgezji i powstałej tolerancji w wyniku podawania peptydu przez 5 kolejnych dni, od efektu pronocyceptywnego, który mógł się ujawnić po zadziałaniu końca C-terminalnego peptydu AWL3106, badanej grupie szczurów podano morfinę w dawce 10 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.*. Zaobserwowano efekt analgetyczny w całej grupie szczurów, który średnio wynosił 40,23 % MPE w 5 min, stopniowo narastał do 30 min gdzie osiągnął swój szczyt i maksimum przy wartości 62,88 % MPE i następnie spadał do wartości 8,03 % w 120 min (Ryc. 32).



Ryc. 32 *Rozwój tolerancji peptydu AWL3106 podanego dożylnie w dawce 5 $\mu\text{mol/kg}$ z uwzględnieniem efektu analgetycznego morfiny podanej siódmego dnia w dawce 10 $\mu\text{mol/kg}$, * $p < 0,05$.*

Dla porównania wykonano test tolerancji na grupie szczurów, którym przez pięć kolejnych dni podawano morfinę w dawce 10 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.*. Zaobserwowano zdecydowanie szybszy rozwój tolerancji w odniesieniu do AWL3106. Maksymalna różnica w efekcie analgetycznym, dla kolejnych przedziałów czasowych pomiędzy dniem rozpoczęcia, a zakończenia podawania związku wynosiła 81 jednostek % MPE w 15 min mierzenia efektu. Efekt analgetyczny był najwyższy przy wartości 29,6 % MPE w 30 min i wartości 30,9 % MPE w 120 min przeprowadzania testu cofania ogona (Ryc. 33).



Ryc. 33 *Rozwój tolerancji morfiny podawanej dożylnie w dawce 10 $\mu\text{mol/kg}$ przez 5 kolejnych dni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.*

III DYSKUSJA

Walka z bólem staje się jednym z najważniejszych problemów stawianych współczesnej medycynie. Od lat opioidy pozostają główną grupą środków stosowanych do leczenia bólu zarówno ostrego jak i przewlekłego. Niestety liczne objawy niepożądane, z racji stosowania tych leków, stają się coraz większym problemem dla lekarzy klinicystów jak i stanowią pogłębiający się coraz bardziej problem społeczny. Dlatego też trwają nieustające prace nad substancjami pozbawionymi tych niepożądanych objawów. Odkrycie mechanizmów transdukcji sygnału bólowego, endogennych mediatorów, ich receptorów i wzajemnych powiązań pomiędzy różnymi systemami przewodzenia bólu, pozwoliło na wytyczenie nowych kierunków badań nad takimi środkami. Nowym podejściem było wypracowanie koncepcji związków, które jednocześnie oddziaływałyby na kilka układów zaangażowanych w przewodzenie sygnału bólowego. W Zakładzie Neuropeptydów IMDiK PAN opracowano strukturę związku chemicznego aktywnie oddziałującego z endogennym układem opioidowym i z tachykininowym. Tak narodziła się koncepcja związków hybrydowych. Skuteczność, jaką może wykazywać peptyd AWL3106 wynika z możliwości oddziaływania zarówno z receptorami opioidowymi i neurokininowymi. Efekt takiego oddziaływania to modulacja, wzmocnienie lub zahamowanie sygnału bólowego w zwojach korzeni grzbietowych. Istota syntezy związków hybrydowych łączących w swojej budowie tak różne farmakofory wynika z wcześniej przeprowadzonych obserwacji, kiedy to w pierwszych opisanych modelach badawczych przedstawiających wzajemne relacje SP i opioidów stwierdzono, że enkefalina wydzielana z interneuronów łączy się z receptorami na błonie presynaptycznej pierwszorzędowego neuronu aferentnego wydzielającego SP. W wyniku tego oddziaływania dochodzi do zahamowania uwalniania SP do przestrzeni synaptycznej i zwolnienia/zahamowania przewodzenia sygnału bólowego (Jessel i Iversen, 1977). Model takiego oddziaływania został uzupełniony badaniami Henry'ego, który opisał i stwierdził, że enkefaliny oraz egzogenne opioidy mogą działać zarówno pre- jak i post- synaptycznie. Presynaptyczne odnosi się do

działania wcześniej już opisanego przez Jessela i Iversena natomiast postsynaptyczne doprowadza do zahamowania pobudliwości błony komórkowej neuronu w wyniku czego również dochodzi do zahamowania przebiegu impulsu bólowego (Henry, 1982).

Pierwsze koncepcje nowych analgetyków opierały się na założeniu, że pobudzając układ opioidowy i jednocześnie hamując neurokininowy można zdecydowanie ograniczyć proces powstawania i przewodzenia bólu. Z drugiej strony takie działanie pozwalało uniknąć negatywnych reakcji ze strony nadaktywacji endogennego układu opioidowego. Jednakże w badaniach okazało się, że zastosowanie antagonistów SP nie jest takie proste, ponieważ mogą one uruchamiać bardzo silne mechanizmy kompensacyjne, które wręcz nasilają ból, a go nie redukują. Badania Lipkowskiego i Misterek z użyciem egzogennego agonisty receptora opioidowego oraz antagonisty SP pokazały, że jedynie niska dawka antagonisty SP może spowodować synergizm efektu w połączeniu z egzogennym, peptydowym agonistą receptora opioidowego (Lipkowski i wsp., 1994, Misterek i wsp., 1994). Na podstawie tych badań można było wysunąć wniosek, że nie tylko ma znaczenie rodzaj użytych agonistów/antagonistów oddziałujących z odpowiednimi dla siebie receptorami, ale i proporcje pomiędzy tymi ligandami.

Kolejne prowadzone badanie oparte na wcześniejszych obserwacjach dowodziły, że czysta SP może podnosić efekt analgetyczny opioidowego agonisty, jeśli jest tylko zastosowana odpowiednia dawka tej ostatniej (Lipkowski i wsp., 1982, 2004, 2006). Wnioski płynące z tych badań jasno sugerowały, że SP uwalniana w rogach tylnych rdzenia kręgowego odgrywa istotną rolę w antynocycpcji. Mechanizm wzmocnienia efektu analgetycznego przez SP nie został dokładnie opisany, ale stwierdzono, że można go odwrócić podając nalokson, co z kolei nasuwa podejrzenie, że potencjalizacja zachodzi przez aktywację neuronów wydzielających opioidy (Foran, 2000). Wzmocnienie efektu analgetycznego poprzez mieszanie różnych leków w medycynie nie jest czymś nowym. W medycynie od dawna stosuje się terapię skojarzoną w leczeniu wybranych jednostek chorobowych, oraz w anestezjologii gdzie jednoczesne podanie leków z grupy zwiotczających mięśnie szkieletowe, *sedativa*, *neuroleptica* i *analgetica*, pozwala uzyskać

zamierzony efekt znieczulenia chirurgicznego, jednocześnie zmniejszając ilość użytych środków. Wykorzystanie działania synergicznego podawanych leków pozwala ograniczyć wystąpienie objawów niepożądanych. Opierając się na wyżej przedstawionych założeniach powstała hipoteza leków hybrydowych, przeciwbólowych, które w jednej cząsteczce łączyłyby różne farmakofory, co pozwoliłoby aktywować różne układy transmisji bólu, ograniczyć dawkowanie, co także zmniejszyłoby wystąpienie objawów niepożądanych. Lek, który w jednej molekułe zawiera końce aktywujące różne układy, uniemożliwia podanie pacjentowi leków zmieszanych w nieprawidłowych proporcjach.

W przedstawionej pracy wykorzystano związek hybrydowy zbudowany z dwóch różnych farmakoforów połączonych ze sobą, a oddziałujących z receptorami opioidowymi i neurokinowymi NK-1 na zasadzie agonista/agonista. Podstawy teoretyczne właśnie takiego rozwiązania zostały przedstawione wyżej, a pierwszych eksperymentalnych dowodów dostarczyła min. Foran. Związek hybrydowy opisany przez nią o nazwie ESP7 był agonistą receptorów opioidowych i neurokininowych a działał jak aktywny analgetyk w modelu bólu ostrego oraz neuropatycznego (Foran, 2000). W naszych badaniach użyty związek AWL3106 to hybryda, która składa się z dermorfiny po stronie N-terminalnej i SP(7-11) po stronie C-terminalnej połączonych dwuaminokwasowym mostkiem [Ser-D-Ala]. Układ taki okazał się bardzo korzystny dla aktywności związku. Jak dowodzono wcześniej wielkość molekuły/hybrydy może mieć istotne znaczenie dla jej aktywności i przenikalności przez barierę krew-mózg (Foran i wsp., 2000). W naszych badaniach udowodniliśmy, że nie tylko maksymalne skrócenie cząsteczki-hybrydy ma wpływ na jej aktywność, ale też podstawnik na końcu N-terminalnym i aminokwasowy mostek, łączący dwa farmakofory. Okazało się, że połączenie dermorfiny z fragmentem SP(7-11) dwuaminokwasowym mostkiem [Ser-D-Ala] nie tylko stabilizuje cząsteczkę związku hybrydowego, ale też ułatwia przekroczenie bariery krew-mózg. Dodatkowo oddzielenie końców N- i C- dwuaminokwasowym mostkiem ułatwia oddziaływanie z właściwymi dla siebie receptorami, które na błonie synaptycznej mogą leżeć blisko siebie (Carr i Cousins, 1998) i dzięki temu swobodnie dopasowują się do kieszonek receptorowych (Lipkowski i wsp., 2004), co skutkuje wysokim

powinowactwem receptorowym badanego związku. W badaniach powinowactwa receptorowego wyliczono, że IC_{50} dla AWL3106 wynosi do receptorów μ $15,52 \text{ nM} \pm 5,31$, a do δ $21,75 \pm 5,55$ co porównując z wartościami czystej dermorfiny (Choi i wsp., 2003) oznacza, że nowo zsyntetyzowany związek wprawdzie utracił wysoką selektywność do receptorów μ , ale zdecydowanie wzrosła jego selektywność do receptorów δ . Może to mieć istotne znaczenie w działaniu analgetycznym AWL3106, ponieważ uważa się, że wysoko selektywni agoniści receptora μ tacy jak morfina mają wprawdzie wysoką aktywność przeciwbólową, ale jest ona powiązana z wyższą zdolnością do uzależnienia i wystąpienia niekorzystnych objawów niepożądanych. Natomiast aktywacja receptorów δ , chociaż ujawnia obniżoną analgetyczną skuteczność to posiada zdecydowanie niższy potencjał uzależniający (Kalso, 2005, Yamamoto i wsp., 2007). Równolegle wzrosła aktywność C-terminalnego końca odpowiadającego za powinowactwo do receptorów NK-1 do wartości $K_i = 7,5 \text{ nM}$ ((referencja 159.2 ± 12.3) (badania przeprowadzone poza Zakładem Neuropeptydów IMDiK PAN)). Wynik ten zgadza się z wcześniejszymi badaniami Lipkowskiego i wsp., który udowodnił, że związki hybrydowe to nie jest prosta kombinacja wyjściowych komponent, ale nowa molekula posiadająca zdecydowanie odmienne właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne w odniesieniu do farmakoforów wyjściowych (Lipkowski i wsp., 2004).

Badania powinowactwa do receptorów μ , δ i NK-1 udowodniły wartość farmakologiczną nowosyntetyzowanej czasteczki AWL3106 i udokumentowały podstawy teoretyczne konstruowania związków hybrydowych, co z kolei dało podstawy do zaprojektowania badań działania antynocycyptycznego w modelu bólu ostrego po podaniu ośrodkowym (podpajęczynówkowo) i obwodowym (dożylnie). W pierwszym etapie badań podano dermorfinę, SP(7-11) i mieszaninę tych związków oraz AWL3106 podpajęczynówkowo. Podanie peptydów tą drogą eliminuje ograniczenia przejścia związków przez barierę krew-mózg oraz efekt I przejścia.

Porównanie efektu analgetycznego mieszaniny dermorfiny z SP(7-11) i odniesienie tych wyników do czystej dermorfiny pokazuje, że SP(7-11) może zmniejszyć lub zwiększyć efekt w zależności od dawki SP(7-11) (Ryc.

12, 13, 14). Świadczy to o odmiennej farmakokinetyce tych układów w odniesieniu do związku hybrydowego będącego syntezą dermorfiny z SP(7-11). Efekt analgetyczny AWL3106 jest zdecydowanie niższy niż mieszaniny dermorfiny i SP(7-11) w dawce równoważnej (Ryc. 23, 12). Otrzymany wynik jest zgodny ze wcześniej przeprowadzonymi badaniami, w których wykazywano, że związki hybrydowe mają różną dystrybucję, czas działania, i metabolizm niż mieszanina związków je budujących (Foran i wsp., 2000). Spadek efektu analgetycznego AWL3106 w porównaniu do mieszaniny dermorfiny i SP(7-11) można tłumaczyć obecnością końca C-terminalnego w hybrydzie. Różny efekt analgetyczny mieszaniny Derm i SP(7-11) w zależności od dawki SP(7-11) może wynikać ze szczególnych własności SP. Jak wcześniej przedstawiono, neuropeptyd ten jest uwalniany z rdzenia kręgowego na skutek działającego bodźca bólowego (Brodin i wsp., 1987, Duggan i wsp., 1987, Yaksh, 1988) może więc działać jak neuroprzekaznik, który ułatwia przewodzenie impulsu bólowego z obwodu (Maszczyńska i wsp., 1998). Jednocześnie w szczególnych warunkach substancja P może indukować analgetyczny efekt (Yaksh i wsp., 1978, Oehme i Hilse, 1980, Hall i Stewart, 1983), oraz potencjalizować efekt analgetyczny opioidów (Kream i wsp., 1993). Wszystko to zależy od dawki SP i proporcji pomiędzy SP, a potencjalizowanym analgetykiem (Lipkowski i wsp., 2006). Działanie analgetyczne związku hybrydowego AWL3106, może być oparte na zdolności uwolnienia endogennych peptydów opioidowych na poziomie rdzenia kręgowego, przez koniec C-terminalny, tak jak to czyni SP (Iadarola i wsp., 1986, Maszczyńska i wsp., 1998). Na poparcie tej hipotezy należy przytoczyć badania anatomiczne na poziomie ultrastruktury rdzenia kręgowego, w których opisano synaptyczny kontakt pierwszorzędowych aferentnych zakończeń włókien nerwowych z neuronami drugiego rzędu uwalniających opioidy (Glazer i Basbaum, 1983, LaMotte i de Lanerolle, 1983, Cho i Basbaum, 1989). Dwuaminokwasowy mostek łączący dwa końce związku hybrydowego może ograniczyć możliwość jednoczesnej aktywacji receptorów opioidowych i NK-1 znajdujących się na tym samym neuronie, a zatem związek hybrydowy prawdopodobnie aktywuje receptory na różnych blisko siebie położonych neuronach. AWL3106 prawdopodobnie z jednej strony naśladuje SP (koniec C-terminalny) i doprowadza do uwolnienia

endogennych peptydów opioidowych, z drugiej strony działa jak typowy analgetyk (koniec N-terminalny) i bezpośrednio aktywuje receptory opioidowe. Innymi słowy AWL3106 przedstawia dwa niezależne działania poprzez bezpośrednie aktywowanie dwóch powiązanych ze sobą neuronalnych układów antynocyceptywnego i neurokininowego, których pobudzenie na odpowiednim poziomie doprowadza do powstania analgezji (Kream i wsp., 2007).

Próbie analizy powyżej przedstawionego zagadnienia przeprowadzono łącząc SP(7-11) z dermorfina w odpowiednio niższym stężeniu niż opisano wcześniej tak, aby ograniczyć maskujące działanie dermorfiny, jakie mogło mieć miejsce przy stężeniu 0,1nmol. Pozwoliło to na opisanie mechanizmów rządzących wzajemnymi relacjami SP-dermorfina. Dodatkowo zmieniając stężenie SP(7-11) ustalono, jaki to może mieć wpływ na działanie analgetyczne dermorfiny. Stwierdzono, że w badanym przedziale dawek SP wywiera silny wpływ na ostateczny efekt analgetyczny Derm. Wpływ ten może być skrajnie różny, a efekt ostateczny zależy od dawki SP(7-11) przy czym wcale nie oznacza to, że wysokie dawki powodują spadek efektu analgetycznego, a stopniowe redukcje tej dawki będą powodować ujawnienie się efektu analgetycznego dermorfiny, aż do momentu, gdy dermorfina zamaskuje działanie SP(7-11). Określono, że działanie synergiczne występuje w określonym przedziale dawek, a przekroczenie tego przedziału w górę lub w dół powoduje przesunięcie działania, w kierunku pronocyceptywnego zastosowywanej mieszanki. Znamienne jest, że dawki niższe SP(7-11) mogą powodować działanie hiperalgezujące, podczas gdy dawki wyższe powodowały tylko zmniejszenie efektu analgetycznego (Ryc. 15, 16, 17). Otrzymane wyniki można powiązać ze wcześniejszymi pracami min. Kreama, który przedstawiał, że niskie (nanogram) dawki SP podane szczurom do przestrzeni podpajęczynówkowej, mogą powodować powstanie analgezji (Stewart i wsp., 1976, Frederickson i wsp., 1978, Kream i wsp., 1993, Maszczyńska, 1999). Silna potencjalizacja efektu analgetycznego dermorfiny wystąpiła dla dawki pośredniej SP(7-11) tj. 0,01 nmola. Efekt ten można tłumaczyć lokalnym, rdzeniowym aktywowaniem przez SP modulującego ból systemu i uwolnieniem endogennych peptydów opioidowych w następstwie czego dochodzi do wywołania analgezji (Kream i

wsp., 1993). Ta modulacja może odbywać się na trzech poziomach a) bezpośrednio aktywowanie neuronów hamujących, b) działanie pośrednie i/lub c) przez synaptyczną modulację (Nakatsuka i wsp., 2005). Wpływ na ostateczny efekt analgetyczny wywiera nie tylko SP(7-11) ale i dermorfina. Suarez-Roca opisał sytuację, w której analgetyk ograniczał uwolnienie SP z błony presynaptycznej lub go wzmacniał w zależności od dawki. Przy czym dawki nmolarne, niższe ograniczały uwolnienie SP a wyższe 100-300 razy wzmacniały uwolnienie SP (Suarez-Roca i wsp., 1992). Otrzymany wynik możemy zatem tłumaczyć dwoma mechanizmami wzajemnie się nakładającymi, a ostateczny wynik jest wypadkową tych reakcji. Z jednej strony na efekt wpływa SP, która w zależności od dawki działa pro- i antynocycyptywnie, z drugiej strony mamy analgetyk, który może wpływać stymulująco lub hamująco na uwolnienie SP, a zatem bezpośrednio moduluje siłę przewodzonego impulsu bólowego. Innymi słowy nie można mówić, że dany czynnik jest pro- lub przeciw- bólowy a raczej, że taka a nie inna jego aktywność wynika z zastosowanej dawki i otoczenia, w jakim przyszło mu działać.

Porównując efekt analgetyczny u szczurów, którym podano podpajęczynówkowo AWL3106 i MF widzimy, że potencjał analgetyczny związku hybrydowego jest około 30 razy większy niż czystej MF (Ryc. 23, 24). Rozkład efektu w kolejnych przedziałach czasowych dla dawki 0,1 nmol jest podobny do efektu opioidów stosowanych w leczeniu bólu i świadczy o możliwym zastosowaniu tego związku jako potencjalnego analgetyku. W przeciwieństwie do efektu analgetycznego wywołanego przez AWL3106 podawanego obwodowo, przy podaniu *i.t.* zwiększenie dawki skutkowało osiągnięciem maksymalnego poziomu % MPE (Ryc. 22). Może to świadczyć o tym, że przy tej dawce szybko następuje wysycenie receptorów opioidowych i ewentualne mechanizmy kompensacyjne nie są w stanie zrównoważyć tego efektu. Wystąpienie objawów niepożądanych takich jak ślinotok, zasinione uszy, kończyny tylne wyprostowane, intensywne łzawienie świadczą, że doszło do jednoczesnej aktywacji receptorów NK-1.

AWL3106 wykazuje, przy podaniu *i.t.* zależność, efekt analgetyczny a dawka, typową dla opioidów takich jak morfina. Zwiększanie dawki owocuje zwiększeniem efektu (Ryc. 22, 23, 25, 26). Dawką graniczną minimalną, jest

0,01nmola. Analgeza przy takiej ilości jest na średnim poziomie 18-43% MPE, ale w badanej grupie szczurów pojawiły się zachowania świadczące o nadaktywności układu neurokininowego, które utrudniały zbadanie zwierząt i interpretację wyników. Taką aktywność można powiązać z budową hybrydy gdzie działanie antynocyceptywne i pronocyceptywne zależy od równowagi działania końców N- i C-. Przy dawce 0,01 nmola równowaga przesuwa się w kierunku działania pronocyceptywnego. Prawdopodobnie jest to związane z tym, że przy takim stężeniu związek hybrydowy AWL3106 nie powoduje zwiększenia uwolnienia endogennych peptydów opioidowych (działanie niebezpośrednie) w rdzeniu kręgowym (Kream i wsp., 1993), a nasila się działanie końca C- wywołującego zachowania świadczące o aktywności układu neurokininowego u badanych zwierząt.

Podanie AWL3106 dożylnie wywołało efekt analgetyczny w badanych grupach szczurów. Zwiększenie dawki dwukrotnie z 1 do 2 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.* spowodowało nie tylko zdecydowane zwiększenie efektu analgetycznego o 40-60 jednostek % MPE w zależności od mierzonego przedziału czasowego, ale wyraźnie przedłużało działanie związku, ponieważ w 120 min testu obserwowano efekt analgetyczny na poziomie 65% MPE (Ryc. 28). Krzywa zależności dawka-efekt w przedziale 1-2 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.* przypomina konfigurację dawkozależną, typową dla efektu opioidowego czystego analgetyku (Ryc. 29). Porównując AWL3106 w dawkach 1 $\mu\text{mol/kg}$ i 2 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.* z równoważnymi dawkami MF widzimy, że nastąpiło zdecydowane wzmocnienie efektu analgetycznego (Ryc. 28, 29). Należałoby ten efekt powiązać z właściwościami związku hybrydowego gdzie komponent SP(7-11) potencjalizuje efekt farmakoforu dermorfinoowego końca N-, podobnie jak niskie dawki SP potencjalizują działanie MF (Kream i wsp., 1993). Kolejnym mechanizmem, który mógłby tłumaczyć otrzymany efekt jest zdolność SP do uwolnienia endogennych peptydów opioidowych w rdzeniu kręgowym (Frederickson i wsp., 1978).

Zwiększenie dawki peptydu AWL3106 do 5 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.* nie zaowocowało zwiększeniem efektu analgetycznego. Pozostał on na poziomie 2 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.* (Ryc. 28). AWL3106 podany dożylnie w tej dawce osiągnął swój efekt pułapowy, na wysokim poziomie 90 % MPE. Wpływ na taki efekt

musi mieć wyjątkowa budowa peptydu AWL3106, który zawiera dwa przeciwstawnie działające farmakofory. Przy dawce 5 $\mu\text{mol/kg}$ *i.v.* wzajemna równowaga pomiędzy farmakoforami działającymi pro- i antynocyceptywnymi ustabilizowała się i zwiększanie dawki nie spowoduje już zwiększenie efektu. Może to wynikać z bezpośredniego działania końca C-terminalnego hybrydy z receptorami NK-1 i wywołania efektu pronocyceptywnego, lub z działania pośredniego poprzez uruchamianie kolejnych mediatorów pronocyceptywnych tj. Asp i Glu (Skilling i wsp., 1988, Smullin i wsp., 1990). Osiągnięcie efektu pułapowego może też wynikać z działania końca N- ponieważ opioidy mogą owalniać SP (Suarez-Roca i wsp., 1992, Maszczyńska, 1999). Do osiągnięcia stanu równowagi przyczynia się również specyficzna budowa bariery krew-mózg, która jest nie tylko barierą fizyczną dla przenikania AWL3106 z krwioobiegu do OUN, ale też, co wydaje się niezwykle istotne z punktu widzenia budowy hybrydy, jest barierą biochemiczną zdolną metabolizować peptyd w obrębie cytoplazmy komórek śródbłonkowych i astrocytów (Witt i wsp., 2001). Możliwa jest też wyjątkowa farmakokinetyka związku i związanie peptydu z efektem II przejścia. Wystąpienie efektu na poziomie 80-90% MPE dla analgetyku jest zjawiskiem korzystnym, ponieważ z medycznego punktu widzenia działamy w przedziale okna terapeutycznego nie wchodząc w obszar działania toksycznego.

Rozwój tolerancji związku hybrydowego AWL3106 następował wolniej w porównaniu do grupy kontrolnej szczurów, która przyjmowała morfinę. Różnica w efekcie pomiędzy tymi dwoma grupami jest znaczna. Maksymalna różnica w jednostkach MPE pomiędzy dniem pierwszym, a piątym trwania tolerancji dla AWL3106 wynosiła 63 jednostki, a dla morfiny 81. Świadczyć to może o tym, że obecność komponenty tachykininowej SP(7-11), a tym samym czynnika pronocyceptywnego, na końcu C-terminalnym ma wpływ na opóźnienie powstania efektu tolerancji. Jest to doświadczone potwierdzenie wcześniejszych obserwacji gdzie np. w leczeniu klinicznym pacjentów z przewlekłym bólem pleców czy bólem nowotworowym poddanych długotrwałej terapii opioidowej nie zaobserwowano rozwoju tolerancji (Portenoy i Foley, 1986, Melzack, 1992,), podobny efekt ujawniono u zwierząt poddanych nocyceptywnej stymulacji (Colpaert i wsp., 1978,

Rahman i wsp., 1993). Te kliniczne i przedkliniczne obserwacje sugerują, że rdzeniowe aminokwasy pobudzające jak i SP, uruchamiając proces nocycypcji, mogą odgrywać korzystny wpływ na opóźnienie rozwoju tolerancji (Foran i wsp., 2000). Przeprowadzone badania sugerują, że aktywacja rdzeniowych NK-1 receptorów jest niezbędna dla opóźnienia rozwoju tolerancji, ponieważ dochodzi do modyfikacji ścieżek sygnałowych w neuronach rogów tylnych rdzenia kręgowego (Foran, 2000). Opóźniony rozwój tolerancji wywołanej związkiem hybrydowym jest wyraźnie związany z wyjątkową budową peptydu AWL3106, gdzie jednoczesna aktywacja receptorów opioidowych i tachykininowych, czyli aktywacja układu stymulującego i hamującego przewodzenie bólu w rdzeniu kręgowym jest istotna dla opóźnienia powstania tego efektu.

Rozwój tolerancji wywołanej związkiem AWL3106 podawanym przez pięć kolejnych dni wywołuje różne zachowanie zwierząt obserwowanych piątego dnia od rozpoczęcia eksperymentu. Obok grupy szczurów, która wykazywała objawy analgezji wystąpiła grupa z pełnym zespołem objawów typowych jak po podaniu SP lub z rozwiniętym zespołem tolerancji (Ryc.31). Podanie MF doprowadziło do określenia przyczyny obserwowanego zespołu objawów. Stwierdzono, że cała badana grupa, u której wywołano tolerancję związkiem AWL3106 odpowiedziała pozytywnie na MF. Efekt analgetyczny w kolejnych przedziałach czasowych był wyższy w 5, 15, 30 min eksperymentu od efektu AWL3106 piątego dnia wytworzonej tolerancji i nieporównywalnie wyższy w odniesieniu do grupy, w której tolerancję wywołano czystą MF (Ryc. 30, 31, 32). Pozytywna odpowiedź na morfinę w tej grupie gryzoni świadczy, że obserwowany zespół objawów był powodowany aktywnością C-końca peptydu hybrydowego. Dodatkowo wysoka aktywność morfiny świadczy, że AWL3106 posiada dodatkową, wyjątkową cechę, a mianowicie nie wywołuje tolerancji krzyżowej na ten alkaloid. Wysoka aktywność morfiny może także wynikać stąd, że oddziałuje z innymi podtypami receptorów opioidowych niż N-terminalny koniec AWL3106, a zatem obok podtypów receptorów, które są niewrażliwe występują receptory wolne i wrażliwe na AWL3106 co w konsekwencji doprowadza do wywołania analgezji.

Podsumowując dyskusję należy przyjąć, że synteza peptydów hybrydowych o działaniu analgetycznym, konstruowanych na zasadzie agonista/agonista receptorów opioidowych i NK-1 może w przyszłości zaowocować zastosowaniem takich właśnie leków w medycynie klinicznej i praktycznym leczeniu bólu. Stosowanie związków hybrydowych w badaniach laboratoryjnych *in vitro* i w modelach zwierzęcych pozwala poznać i opisać niezwykle złożone mechanizmy związane z transmisją sygnału bólowego. Okazuje się, że dwa z pozoru przeciwstawne układy w określonych warunkach mogą oddziaływać na siebie synergicznie lub hamująco, a efekt ostateczny zależy od równowagi w działaniu połączonych farmakoforów. Stosowanie mieszanek leków podanych w niewłaściwych proporcjach może doprowadzić do ujawnienia się wielu zaskakujących i bardzo niebezpiecznych objawów niepożądanych. Związki hybrydowe pozwalają właśnie uniknąć tego szerokiego wachlarza efektów zależnych od proporcji leków. W tym przypadku scalając w jednej formie dwóch agonistów dermorfinę i SP(7-11) uzyskano układ z jedną zmienną, której wartość analgetyczna zależała od jednej niewiadomej tzn. dawki związku hybrydowego.



IV PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Podstawą pracy jest założenie, że peptyd o powinowactwie do receptorów opioidowych oraz tachykininowych może stanowić nowy rodzaj związków przeciwbólowych.

1. Wstępne badania fragmentu farmakoforowego substancji P wykazały, że w zależności od dawki związek przejawia właściwości antynocyceptywne bądź nocyceptywne.
2. We współdziałaniu peptydu opioidowego i tachykininowego obserwuje się dawkozależne efekty synergiczne lub antagonistyczne.
3. Otrzymano związek (o roboczym symbolu AWL3106), który kowalencyjnie łączył farmakofor opioidowy oraz tachykininowy. Badania receptorowe wykazały wysokie powinowactwo peptydu do receptorów opioidowych μ , δ oraz tachykininowych NK-1.
4. Związek AWL3106 podany podpajęczynówkowo wykazuje działanie antynocyceptywne w modelu bólu ostrego.
5. Badanie zależności aktywności od dawki peptydu i porównanie z działaniem morfiny wykazuje odmienny profil dawka/efekt. Obserwowany efekt pułapowy sugeruje ujawnienie się nocyceptywnej komponenty tachykininowej. Efekt pułapowy może zapobiegać przedawkowaniu związku.
6. Dawki o porównywalnym z morfiną działaniu antynocyceptywnym wywołują znacznie wolniej tolerancję lekową.
7. Wywołanie tolerancji na komponent opioidowy, u części zwierząt powoduje dominację części tachykininowej (nocyceptywnej) powodującej występowanie nocycepcji.
8. Peptyd AWL3106 stanowi przykład nowego typu analgetyku o znacznie zredukowanych negatywnych efektach ubocznych.

V STRESZCZENIE

Jednym z niezbędnych elementów prawidłowego funkcjonowania organizmu jest zdolność czucia bólu, mechanizmu ostrzegająco-ochronnego, zależnego od wielu subiektywnych czynników przedstawionych w części pierwszej pracy. W przebiegu choroby staje się on jednym z najbardziej dokuczliwych i psychicznie destrukcyjnych czynników. Metod i środków łagodzących ból poszukiwano od niepamiętnych czasów, jednak dopiero w ostatnich latach poznano układy zaangażowane w transmisję i regulację sygnału bólowego. Wśród nich układ opioidowy zajmuje naczelne miejsce. Opioidem najlepiej poznanym i najczęściej stosowanym w klinice jako lek jest alkaloid morfina. Morfina stanowi jednocześnie swoisty standard, z którym porównuje się inne leki przeciwbólne. Porównanie dotyczy zarówno pożądanej siły działania analgetycznego jak i objawów niepożądanych. Niestety niepożądane działania morfiny, takie jak: tolerancja, uzależnienie, depresja oddychania, skurcz zwieraczy, nudności, wymioty, euforia, znacznie ograniczają stosowanie morfiny i innych dostępnych analgetyków opioidowych, szczególnie w terapii bólów przewlekłych.

Aktywacja lub blokowanie innych systemów neuromodulujących sygnały bólowe może być skuteczną metodą wspomagania działania opioidów, pozwalającą na obniżenie stosowanych dawek leków. W klinice wiedzę tą wykorzystuje się stosując terapię skojarzoną w leczeniu bólu. Jednakże różny profil farmakokinetyczny i farmakodynamiczny leków oraz potencjalne możliwości błędów w dawkowaniu stwarza zagrożenie w stosowaniu właśnie takiej terapii. Pomimo tych niebezpieczeństw skuteczność terapii skojarzonej zaowocowała zmianą podejścia w poszukiwaniu nowych leków. W miejsce leków selektywnie działających na jeden typ receptora, lub szlak neuroprzekaźnikowy, proponuje się tworzenie leków hybrydowych, które w jednej cząsteczce zawierają farmakofory receptorów zaangażowanych w określone działanie. Szczegółowe opisanie parametrów farmakologicznych cząsteczki hybrydowej pozwala na poznanie profilu terapeutycznego. Jednocześnie odpowiednie zaprojektowanie cząsteczki skutkuje uzyskaniem molekuly o nowych właściwościach fizyko-

chemicznych i biologicznych, w tym o zmienionej możliwości przechodzenia przez bariery biologiczne, zmienionej podatności na metabolizm. W przypadku bólu, przy takim modelowaniu należy wziąć pod uwagę dwa najważniejsze układy związane z tym procesem a mianowicie układ neurokininowy z działającą pronocyceptywnie substancją P i antynocyceptywny endogenny układ opioidowy.

W niniejszej pracy opisano koncepcję powstania związków hybrydowych, działających jako agoniści receptorów opioidowych i tachykininowych na przykładzie związku o nazwie AWL3106. Wyniki badań w części poświęconej powinowactwu receptorowemu do właściwych dla siebie receptorów pokazały, że związki takie wykazują powinowactwo do receptorów μ , δ i NK-1. Należy pamiętać, że nowosyntetyzowana molekula hybrydowa nie stanowi zwykłego połączenia dwóch komponent. W większości przypadków powstaje nowa cząsteczka o oryginalnym profilu aktywności. Związek AWL3106 wykazuje duże powinowactwo do receptorów opioidowych μ i δ oraz tachykininowych typu NK-1.

Pozytywne wyniki powinowactwa receptorowego dały podstawę do zaprojektowania schematu dalszych badań w modelach bólu ostrego. W pierwszym, wstępnym etapie badań *in vivo* przeprowadzono badania mieszaniny dwóch związków o działaniu agonistycznym na receptory opioidowe (dermorfina) i tachykininowe (SP(7-11)). Wyniki doświadczeń z użyciem różnej kombinacji dawek pozwoliły stwierdzić, że maksymalny możliwy efekt przeciwbólowy osiągnięto przy zmieszaniu dermorfiny z SP(7-11) w dawkach pośrednich. W tej właśnie proporcji dochodzi do zaskakującego efektu, a mianowicie, C-terminalny fragment SP odpowiedzialny za działanie nocyceptywne, wzmacnia efekt analgetyczny czystej dermorfiny. Stwierdzono, że takie działanie występuje w określonym przedziale dawek, a przekroczenie tego przedziału w górę lub w dół powoduje przesunięcie działania w kierunku nocyceptywnego zastosowanej mieszanki, przy czym dawki niższe SP(7-11) mogą powodować działanie hiperalgezujące, podczas gdy dawki wyższe powodowały zmniejszenie efektu analgetycznego dermorfiny.

Związek AWL3106 będący hybrydą tych dwóch substancji podany podpajęczynówkowo wykazywał efekt typowego analgetyku jakim jest np.

morfina. Z jednej strony wraz ze zwiększeniem dawki rósł efekt przeciwbólowy aż do osiągnięcia maksymalnego efektu, z drugiej strony rozkład graficzny efektu w czasie dla dawek pośrednich przypominał kształt dzwona z maksymalnym efektem powstałym w kilkanaście minut od podania. W odniesieniu do standardu jakim była morfina, AWL3106 wykazywał około 30 razy wyższy potencjał analgetyczny.

Związek hybrydowy AWL3106 podany dożylnie wykazywał silne działanie analgetyczne. Zwiększenie podawanych dawek skutkowało nie tylko wzrostem efektu analgetycznego, ale i wyraźnie wydłużało czas działania związku. Porównując potencjał analgetyczny w odniesieniu do MF stwierdzono, że jest on kilka razy wyższy. Dodatkowo badania wykazały, że przekroczenie określonej dawki nie skutkowało dalszym wzrostem efektu analgetycznego, a utrzymanie na stałym poziomie. AWL3106 osiąga swój efekt pułapowy na wysokim poziomie 80% MPE.

Szybkość powstania tolerancji na lek stanowi ważną cechę przy długotrwałym podawaniu analgetyku. Stwierdzono, że rozwój tolerancji w grupie szczurów, którym podano AWL3106 następuje wolniej niż w tej, która otrzymywała morfinę.

Zastosowanie związku hybrydowego AWL3106 oddziałującego z receptorami opioidowymi i tachykininowymi na zasadzie agonista-agonista pozwoliło stwierdzić skuteczność właśnie takiego rozwiązania w modelu bólu ostrego. Spowolniony efekt wywoływania tolerancji lekowej jest prawdopodobnie wynikiem jednoczesnego działania końców N- i C- związku hybrydowego. Kolejnym istotnym czynnikiem wartościującym związek hybrydowy jest inny profil farmakokinetyczny w odniesieniu do komponent go budujących.

Wyniki badań prezentowane w niniejszej pracy wskazują nowe drogi poszukiwań środków o działaniu przeciwbólowym, odkrywają również wielkie możliwości jakie kryją się w związkach hybrydowych budowanych wg koncepcji agonista-agonista. Dane te wyraźnie pokazują, że związek hybrydowy to nowa molekula zdolna precyzyjnie i skutecznie ograniczyć powstawanie bólu ostrego i tolerancji.

VI PIŚMIENNICTWO

- Alexander S.P.H., Mathie A., Peters J.A. *Opioid and opioid-like. Guide to receptors and channels (GRAC), 3rd edn.* Br. J. Pharmacol. (2008), **153**: S1–209.
- Battaglia G. and Rustioni A. *Co-existence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey.* J. Comp. Neurol. (1988), **277**: 302-312
- Beaujouan J.C., Torrns Y., Saffroy M., Glowinski J. *Quantitative autoradiographic analysis of the distribution of binding sites for [¹²⁵I] Bolton Hunter derivatives of eledoisin and substance P in the rat brain.* Neurosci. (1986), **18**: 857-75
- Botros M. *Characterization of substance P(SP) aminoterminal SP (1-7) binding in brain regions and spinal cord of the male rat: Studies on the interaction with opioid related pathways.* Acta Universitatis Upsaliensis. (2008), Uppsala
- Brady L.S., Holtzman S.G. *Analgesic effects of intraventricular morphine and enkephalins in nondependent and morphine-dependent rats.* J. Pharmacol. Exp. Ther. (1982), **222**: 190-197
- Brodin E., Linderoth B., Gazelius B., Ungerstedt U. *In vivo release of substance P in cat dorsal horn studied with microdialysis.* Neurosci. Lett. (1987), **76**: 357-362
- Carr D.B. and Cousins M.J. *Spinal route of analgesia. Opioids and future options.* In: Neural Blockade in Clinical Anesthesia and Management of Pain. Third Edition, ed. by Cousins M.J. and Bridenbaugh P.O. wyd. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1998), 915-983
- Carr D.B., Lipkowski A.W. and Silbert B.B. *Biochemistry of the opioid peptides.* In: Opioids in Anesthesia II, ed. by Estafanous F.G. wyd. Butterworth-Heinemann (1991), 3-16

- Chang H.M., Berde C.B., Holz G.G., Steward G.F., Kream R.M. *Sufentanil, morphine, met-enkephalin, and kappa-agonist (U-50, 488H) inhibit substance P release from primary sensory neurons: A model for presynaptic spinal opioid actions.* *Anesthesiology* (1989), **70**:672-677
- Chang M.M., Leeman S.E., Niall H.D. *Amino acid sequence of substance P.* *Nature* (1971), **232**: 86-87
- Cho H.J., Basbaum A.I. *Ultrastructural analysis of dynorphin B-immunoreactive cells and terminals in the superficial dorsal horn of the deafferented spinal cord of the rat.* *J. Comp. Neurol.* (1989), **281**: 193-205
- Choi H., Murray T.F., Aldrich J.V. *Dynorphin-based potential affinity labels for mu-opioid receptors.* *J. Peptide Res.* (2003), **61**: 40-45
- Colpaert F.C., Niemegeers C.J.E., Janssen .PA.J. *Nociceptive stimulation prevents development of tolerance to narcotic analgesia.* *Eur. J. Pharmacol.* (1978), **49**: 335-336
- Costigan M. and Woolf C. *Pain: Molecular Mechanisms.* *J. Pain* (2000), **1**: 35-44
- Cridland R.A., Henry J.L. *N- and C-terminal fragments of substance P: Spinal effects in the rat tail flick test.* *Brain Res. Bull.* (1988), **20**: 429-432
- Dam T.-V., Escher E., Quiron R. *Visualization of neurokinin-3 receptor sites in rat brain using the highly selective ligand [³H]senktide.* *Brain Res.* (1990), **506**: 175-179
- Duggan A.W. *Neuropeptide release in the spinal cord in response to noxious and non-noxious stimulation.* *Neuropeptides* (1992), **22**: 19
- Duggan A.W., Hendry I.A., Morton C.R., Hutchison W.D., Zhao Z.Q. *Cutaneous stimuli releasing immunoreactive substance P in the dorsal horn of the cat.* *Brain Res.* (1988), **451**: 261-273
- Duggan A.W., Moreton C.R., Zhao Z.Q., Hendry I.A. *Noxious heating of the skin releases immunoreactive substance P in the substantia gelatinosa of the cat: a study with antibody microprobes.* *Brain Res.* (1987), **403**: 345-349

- Erspamer V. *The tachykinin peptide family*. Trends Neurosci. (1981), **4**: 267-269
- Foran S.E. *Characterization of novel chimeric analgesic peptides*. PhD dissertation, (2000), Tufts University
- Foran S.E., Carr D.B., Lipkowski A.W., Maszczyńska I., Marchand J.E., Misicka A., Beinborn M., Kopin A.S. and Kream R.M. *A substance P-opioid chimeric peptide as a unique nontolerance-forming analgesic*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000), **97** 7621-7626
- Foran S.F., Carr D.B., Lipkowski A.W., Maszczyńska I., Marchand J.E., Misicka A., Beinborn M., Kopin A.S., Kream R.M. *Inhibition of morphine tolerance development by a substance P-Opioid peptide chimera*. J. Pharmacol. Exp. Ther. (2000), **295**: 1142-1148.
- Frederickson R.C.A., Burgis V., Harreil C.E., Edwards J.D. *Dual action of SP on nociception: Possible role of endogenous opioids*. Science (1978), **199**: 1359-1362
- Gaddum J.H., Schild H. *Depressor substances in extracts of intestine*. J. Physiol. (1935), **83**: 1-14
- Gerard N.P., Bao L., Ping H.X., Gerard C. *Molecular aspects of the tachykinin receptors*. Regular. Pept. (1993), **43**: 21-35
- Gernandt B. *Untersuchung über die biologische Wirkung der Substanz P*. Acta Physiol. Scand. (1942), **3**: 270-274
- Gilbert P.E., Martin W.R. *The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent, morphine dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog*. J. Pharmacol. Exp. Ther. (1976), **198**: 66-82
- Glazer E.J., Basbaum A.I. *Opioid neurons and pain modulation: An ultrastructural analysis of enkephalin in cat superficial dorsal horn*. Neurosci. (1983), **10**: 357-376
- Go V.L.M, Yaksh T.L. *Release of SP from the cat spinal cord*. J. Physiol. (1987), **391**: 141-167

- Goettl V.M., Larson A.A. *Activity at phencyclidine and mu opioid sites mediates the hyperalgesic and antinociceptive properties of the N-terminus of SP in a model of visceral pain.* Neurosci. (1994), **60**: 375-382
- Goldstein A., Lowney L.I., Pal B.K. *Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of the mouse brain.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1971), **68**: 1742-1747
- Gomes I., Jordan B.A., Gupta A., Trapaidze N., Nagy V., Devi L.A. *Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy.* J. Neurosci. (2000), **20**: 110
- Gumulka W.S., Rewerski W. *Terapia Bólu.* (1989), PZWL, Warszawa
- Hall M.E. and Stewart J. *Substance P and behavior: opposite effects of N-terminal and C-terminal fragments.* Peptides (1983), **4**: 763-768
- Harrison S., Geppetti P. *Substance P.* Inte. J. Biochemi. Cell Biol. (2001), **33**: 555-576
- Henry J.L. *Discussion of nomenclature for tachykinin and tachykinin receptors.* In: Henry J.L., Couture R., Cuello A.C., Pelletier G., Quirion R., Regoli D., editors. Substance P and Neurokinin. New York, Springer-Verlag, (1987), 17-18
- Henry J.L. *Relation of substance P to pain transmission: neurophysiological evidence in Substance P in the nervous system.* Ciba Found. Symp. (1982), 206-224
- Hershey A.D., Krause J.E. *Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor.* Science (1990), **247**: 958-962
- Hokfelt T., Kellerth J.O., Nilsson G., Pernow B. *Substance P: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons.* Science (1975a), **190**: 889-890
- Hokfelt T., Pernow B. & Wahren J. *Substance P: a pioneer amongst neuropeptides.* J. Internal Medi. (2001), **249** s.27-40

- Hu H.Z., Li Z.W., Si J.Q. *Evidence for the existence of substance P autoreceptor in the membrane of rat dorsal root ganglion neurons.* *Neurosci.*, (1997), **77**: 535-541
- Hughes J., Smith T.W., Kosterlitz H.W., Fothergill L.A., Morgan B.A., Morris H.R. *Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity.* *Nature* (1975), **258**: 577-579.
- Hylden J.L.K., Wilcox G.L. *Intrathecal opioids block a spinal action of SP in mice: Functional importance of both mu and delta receptors.* *Eur. J. Pharmacol.* (1983), **86**: 95-98
- Hylden J.L.K., Wilcox G.L. *Pharmacological characterization of SP-induced nociception in mice: Modulation by opioid and noradrenergic agonists at the spinal level.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1983), **226**: 398-404
- Iadarola M.J., Tang J., Costa E., Yang H.Y. *Analgesic activity and release of (MET3)enkephalin-ARG6-Gly7-Leu8 from rat spinal cord in vivo.* *Eur. J. Pharmacol.* (1986), **121**: 39-48
- Igwe O.J., Felice J., Seybold V.S., Larson A.A. *Optimization of high-performance liquid chromatography-radioimmunoassay protocols for the analyses of substance P and some of its metabolic fragments.* *J. Chromatogr.* (1988), **432**: 113-126
- Igwe O.J., Kim D.C., Seybold V.S., Larson A.A. *Specific binding of substance P aminoterminal heptapeptide [SP(1-7)] to mouse brain and spinal cord membranes.* *J. Neurosci.* (1990), **10**: 3653-3663
- Igwe O.J., Sun X., Larson A.A. *Role of substance P (SP) metabolism in SP-induced desensitization in mice.* *Soc. Neurosci. Abstr.* (1988), **14**: 709
- Jessel T.M., Iversen L.L. *Opiate analgesics inhibit substance P release from the rat trigeminal nucleus.* *Nature* (1977), **268**: 549-551
- Kalso E. *Improving opioid effectiveness: from ideas to evidence.* *Eur. J. Pain* (2005), **9**: 131-135.

- Kawagoe R.K., Onodera K. and Takeuchi A. *Release of endogenous glutamate from the frog spinal cord following dorsal root stimulation*. Biomed. Res. (1985), **6**: 239-245
- Kawagoe R.K., Onodera K. and Takeuchi A. *The release of endogenous glutamate from the newborn rat spinal cord induced by dorsal root stimulation and substance P*. Biomed. Res. (1986), **7**: 253-259
- Kosson P., Bonney I., Carr D.B., Lipkowski A.W. *Endomorphins interact with tachykinin receptors*. Peptides (2005), **26**: 1667-1669
- Krause J.E., Chirgwin J.M., Carter M.S., Xu Z.S., Hershey A.D. *Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1987), **84**: 881-885
- Kream R.M., Kato T., Shimonaka H., Marchand J.E. and Wurm W.H. *Substance P markedly potentiates the antinociceptive effects of morphine sulfate administered at the spinal level*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1993), **90**: 3564-3568
- Kream R.M., Liu N.-J., Zhuang M., Esposito P.L., Esposito T.R., Stefano G.B., Witmeyer III J.J. *Synthesis and pharmacological of a morphine/substance P chimeric molecule with full analgesic potency in morphine-tolerant rats*. Med. Sci. Monit. (2007), **13**: 25-31
- Kreeger J.S. and Larson A.A. *The substance P amino-terminal metabolite substance P (1-7), administered peripherally, prevents the development of acute morphine tolerance and attenuates the expression of withdrawal in mice*. J. Pharmacol. Exp. Ther. (1996), **279**: 662-667
- Kuraishi Y., Hirota N., Sato Y., Hino Y., Satoh M., Takagi H. *Evidence that substance P and somatostatin transmit separate information related to pain in the spinal dorsal horn*. Brain Res. (1985), **325**: 294-298
- LaMotte C.C., de Lanerolle N.C. *Ultrastructure of chemically defined neuron systems in the dorsal horn of the monkey. II. Methionine-enkephalin immunoreactivity*. Brain Res. (1983), **274**: 51-63.
- Larson A.A. *Desensitization to intrathecal substance P in mice: Possible involvement of opioids*. Pain. (1988), **32**: 367-374

- Lee C.M., Iversen L.L., Hanley M.R., Sandberg B.E. *The possible existence of multiple receptors for substance P*. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* (1982), **318**: 281-287
- Lee C.M., Sandberg B.E.B., Hanley M.R., Iversen L.L. *Purification and characterization of a membrane-bound substance P-degrading enzyme from human brain*. *Eur. J. Biochem.* (1981), **114**: 315-327
- Leeman S.E., Ferguson S.L. *Substance P: an historical perspective*. *Neuropepti.* (2000), **34**: 249-254
- Lei S.Z., Lipkowski A.W., Wilcox G.L. *Opioid and neurokinin activities of substance P fragments and their analogues*. *Eur. J. Pharmacol.* (1991), **163**: 209-215
- Lembeck F. *The archeology of substance P*. *Neuropepti.* (2008), **42**: 444-453
- Lipkowski A.W., Carr D.B., Misicka A., Misterek K. *Biological activities of a peptide containing both casomorphin-like and substance P antagonist structural characteristics*. In: *Beta-casomorphins and related peptides: recent developments*, ed. by Brantl V., Teschemacher H., Weinheim V.C.H., New York (1994), 113-118
- Lipkowski A.W., Misicka A., Carr D.B., Ronsisvalle G., Kosson D., and Maszczyńska Bonney I. *Neuropeptide mimetics for pain management*. *Pure Appl. Chem.* (2004), **76**: 941-950
- Lipkowski A.W., Carr D.B., Bonney I., Kosson P. *Opioid-Substance P chimeric peptides*. *Handbook of Biologically Active Peptides* (2006), 1373-1377
- Lipkowski A.W., Carr D.B., Misicka A., Misterek K. *Biological activities of a peptide containing both casomorphin-like and substance P antagonist structural characteristics*. In: Brantl. V.; Teschemacher H., eds. *Beta-casomorphins and related peptides: Recent developments*. New York: VCH Weinheim; (1994), 113-118
- Lipkowski A.W., Konecka A.M., Sroczyńska I., Przewlacki R., Stala L., Tam S. *Bivalent opioid peptide analogues with reduced distances between pharmacophores*. *Life Sci.* (1987), **40**: 2283-2288

- Lipkowski A.W., Osipiak B. and Gumulka W.S. *An approach to the elucidation of self-regulatory mechanism of substance P action: II. Biological activity of new synthetic peptide analogs related both to enkephalin and substance P.* Life Sci. (1983), **33**: 141-144
- Lipkowski A.W., Osipiak B., Członkowski A., Gumulka W.S. *An approach to the elucidation of self-regulatory mechanism of substance P action.* Pol. J. Pharm. (1982), **34**: 63-68
- Lord J.A.H, Waterfield A.A., Hughes J., Kosterlitz H.W. *Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors.* Nature (1977), **267**: 495-499
- MacDonald M.R., Takeda J., Rice C.M., Krause J.E. *Multiple tachykinins are produced and secreted upon post-translational processing of the three substance P precursor proteins, α -, β -, and γ -preprotachykinin. Expression of the preprotachykinins in AtT-20 cells infected with vaccine virus recombinants.* J. Biol. Chem. (1989), **264**: 15578-15598
- Maggi C.A., Patacchini R., Rovero P., Giachetti A. *Tachykinin receptors and receptor antagonists.* J. Auton. Pharmac. (1993), **13**: 23-93
- Mantyh P.W., Mantyh C.R., Gates T., Vigna S.R., Maggio J.E. *Receptor binding sites for substance P and substance K in the canine gastrointestinal tract and their possible role in inflammatory bowel disease.* Neurosci. (1988), **25**: 817-837
- Martin W.R., Eades C.G., Thompson J.A., Huppler R.E., Gilbert P.E. *The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine dependent chronic spinal dog.* J. Pharmacol. Exp. Ther. (1976), **197**: 517-532
- Maszczyńska I. *Ośrodkowe, przeciwbólowe działanie peptydu AA501, hydrazynu N'-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-fenylalanylo, N''-benzyloksykarbonylo-tryptofanu.* Rozprawa doktorska, (1999), Warszawa
- Maszczyńska I., Lipkowski A.W., Carr D., Kream R.M. *Dual functional interactions of substance P and opioids in nociceptive transmission: review and reconciliation.* Analgesia (1998), **3**: 259-268

- Maszczyńska Boney I., Foran A.F., Marchand J.E., Lipkowski A.W., Carr D.B. *Spinal antinociceptive effects of AA501, a novel chimeric peptide with opioid receptor agonist and tachykinin receptor antagonist moieties*. Eur. J. Pharmacol. (2004), **488**: 91-99
- Matsamura H., Sakurada T., Hara H., Sakurada S., Kisara K. *Characterization of the hyperalgesic effect induced by intrathecal injection of substance P*. Neuropharmacol. (1985), **4**: 421-426
- Meini S., Mak J.C.W., Rohde J.A.L., Rogers D.F. *Tachykinin control of ferret airways, mucus secretion, bronchoconstriction and receptor mapping*. Neuropept. (1993), **24**: 81-89
- Melzack R. *Human versus pain. The dilemma of morphine*. In: Advances in Pain Research and Therapy, Edited by Sicuteri F., Terenius L., Vecchiet L., Maggi C.A., Nicolodi M. and Alessandri M. Raven Press, New York, (1992), **20**: 149-159
- 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. (1994), **54**: 939-944
- Mussap C.J., Geraghty D.P., Burcher E. *Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective*. J. Neurochem. (1993), **6**: 1987-2009
- Nakanishi S. *Mammalian tachykinin receptors*. A. Rev. Neurosci. (1991), **14**: 123-136
- Nakanishi S. *Substance P precursor and kininogen: their structures gene organization and regulation*. Physiol. Rev. (1987), **67**: 1117-1142
- Nakatsuka T., Chen M., Takeda D., King Ch., Ling J., Xing H., Ataka T., Vierck Ch., Yezierski R., Gu J.G. *Substance P-driven feed-forward inhibitory activity in the mammalian spinal cord*. Mol. Pain. (2005), **1**: 20
- Nawa H., Kotani H., Nakanishi S. *Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing*. Nature (1984), **312**: 729-734

- Nowak J.M., Macdonald R.L. *Substance P: ionic basis for depolarizing of mouse spinal cord neurons in cell culture*. J. Neurosci. (1982), **2**: 1119-1128
- Nyberg F., Le Greves P., Sundqvist S., Terenius L. *Characterization of substance P (1-7) and (1-8) generating enzyme in human cerebrospinal fluid*. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1984), **125**: 244-250
- Oehme P., Hilse H. *Substance P: does it produce analgesia or hyperalgesia?* Science (1980), **208**: 305-307
- Pernow B. *Pharmacology of substance P*. Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), **10**: 393-402
- Pernow B. *Studies on substance P purification, occurrence, and biological actions*. Acta Physiol. Scand. Suppl. (1953), **29**: 1-89
- Persson S., Le Greves P., Thornwall M., Eriksson U., Silberring J., Nyberg F. *Neuropeptide converting and processing enzymes in the spinal cord and cerebrospinal fluid*. In: Nyberg F., Sharma H.S., Wiesenfeld-Hallin Z., editors. *Neuropeptides in the Spinal Cord*. Amsterdam: Elsevier Science B.V., (1995), 111-130
- Pert C.B., Snyder S.H. *Opiate receptor: demonstration in nervous tissue*. Science (1973), **179**: 1011-1014
- Piercey M.F., Dobry P.J., Schroeder L.A., Einspahr F.J. *Behavioral Evidence that substance P may be a spinal cord sensory neurotransmitter*. Brain Res. (1981), **210**: 407-412
- Portenoy R.K., and Foley K.M. *Chronic use of opioid analgesics in non-malignant pain: Report of 38 cases*. Pain. (1986), **25**: 171-186
- Powell D., Leeman S.E., Tregear G.W., Niall H.D., Potts J.J.T. *Radioimmunoassay for substance P*. Nature. (1973), **241**: 252-254
- Radhakrishnan V., and Henry J.L. *Novel substance P antagonist, CP-96,345, blocks responses of cat spinal dorsal horn neurons to noxious cutaneous stimulation and to substance P*. Neurosci. Lett. (1991), **132**: 39-43

- Rahman A.F.M.M., Takahashi M. and Kaneto H. *Development of tolerance to morphine antinociception in mice treated with nociceptive stimulation.* Japan J. Pharmacol. (1993), **63**: 59-64
- Randic M., Miletic V. *Effect of substance P in cat dorsal horn neurons activated by noxious stimuli.* Brain Res. (1977), **128**: 164-169
- Regoli D., Boudon A., Fauchere J.L. *Receptors and antagonists for substance P and related peptides.* Pharmacol. Rev. (1994), **46** s.551-599
- Reisine T., Bell I. *Molecular biology of opioid receptors.* Trends Neurosci. (1993), **16**: 506-510
- Rice A.S.C. and Justis D.M. *Pain mechanisms and pathways.* Curr. Anaesth. Criti. Care (1999), **10**: 98-104
- Sakurada T., Le Greves P., Stewart J., Terenius L. *Measurement of substance P metabolites in rat CNS.* J. Neurochem. (1985), **44**: 718-722
- Shigemoto R., Yokoto Y., Tsuchida K., Nakanishi S. *Cloning and expression of a rat neuromedin K receptor cDNA.* J. Biol. Chem. (1990), **265**: 623-628
- Simon E.J., Hiller J.M., Edelman J. *Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ³H-etorphine to rat brain homogenate.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1973), **70**: 1947-1949
- Skilling S.R., Smullin D.H., Larson A.A. *Differential effects of C-and N-terminal substance P metabolites on the release of amino acid neurotransmitters from the spinal cord: potential role in nociception.* J. Neurosci. (1990), **10**: 1309-1318
- Skilling S.R., Smullin D.H., Larson A.A. *Extracellular amino acid concentrations in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation.* J. Neurochem. (1988), **51**: 127-132
- Smullin D.H., Skilling S.R., and Larson A.S. *Interactions between substance P, calcitonin gene-related peptide, taurine, and excitatory amino acids in the spinal cord.* Pain (1990), **42**: 93-101
- Snijdelaar D.G., Dirksen R., Slappendel R. and Crul B.J. *Substance P.* Eur. J. Pain (2000), **4**: 121-135

- Snyder S.H. *Neurotransmitter and drug receptors in the brain*. Biochem. Pharmacol. (1975), **24**: 1371-1374
- Stanasila L., Pattus F., Massotte D. *Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: Human opioid receptors under scrutiny*. Biochimie (1998), **80**: 563-371
- Stewart J.M., Getto C.J., Neldner K., Reeve E.B., Krivoy W.A., Zimmermann E. *Substance P and analgesia*. Nature (1976), **262**: 784-785
- Stewart J.M., Hall M.E., Harkins J., Frederickson R.C.A., Terenius L., Hokfelt T., Krivoy W.A. *A fragment of substance P with specific central activity: SP(1-7)*. Peptides (1982), **3**: 851-857
- Suarez-Roca H., Abdullah L., Zuniga J., Madison S., Maixner W. *Multiphasic effect of morphine on the release of substance P from rat trigeminal nucleus slices*. Brain Res. (1992), **579**: 187-194
- Takano M., Takano Y., Yaksh T.L. *Release of calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP), and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) from rat spinal cord: Modulation by α_2 agonist*. Peptides (1993), **14**: 371-378
- Terenius L. *Characteristics of the „receptor“ for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain*. Acta Pharmacol. Toxicol. (1973), **33**: 377-384
- Tregear G.W., Niall H.D., Potts J.T., Leeman S.E., Chang M.M. *Synthesis of substance P*. Nature (1971), **232**: 87-89
- Tsuchida K., Shigemoto R., Yokoto Y., Nakanishi S. *Tissue distribution and quantification of the mRNAs of three tachykinin receptors*. Eur. J. Pharmacol. (1990), **193**: 751-757
- von Euler U.S., Gaddum J.H. *An unidentified depressor substance in certain tissue extract*. J. Physiol. (1931), **72**: 74-87
- von Euler U.S., Pernow B. *Neurotropic effects of substance P*. Acta Physiol. Scand. (1956), **36**: 265-275

- Witt K.A., Gillespie T.J., Huber J.D., Egleton R.D., Davis T.P. *Peptide drug modifications to enhance bioavailability and blood-brain-barrier permeability*. *Peptides* (2001), **22**: 2329-2343
- Wordliczek J., Dobrogowski J. *Ból ostry*. (2002), Wydawnictwo Uniwersytetu Krakowskiego, Kraków
- Wörz R. *Farmakoterapia bólu*. (1992), PZWL, Warszawa
- Yaksh T.L., Jessel T.M., Gamse R., Mudge A.W., Leeman S.E. *Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo*. *Nature* (1980), **286**: 455-457
- Yaksh T.L. *Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids*. *Brain Res.* (1988), **458**: 319-324
- Yaksh T.L., Frederickson R.C., Huang S.P., Rudy T.A. *In vivo comparison of the receptor populations acted upon in the spinal cord by morphine and opioid pentapeptides in the production of analgesia*. *Brain Res.* (1978), **148**: 516-520
- Yaksh T.L., Rudy T.A. *Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space*. *Phys. Behav.* (1976), **17**: 1031-1036
- Yamamoto T., Nair P., Davis P., Ma S., Navratilova E., Moye S., Tumati S., Lai J., Vanderah T.W., Yamamura H.I., Porreca F., and Hruby V.J. *Design, synthesis, and biological evaluation of novel bifunctional C-terminal-modified peptides for δ/μ opioid receptor agonists and neurokinin-1 receptor antagonists*. *J. Med. Chem.* (2007), **50**: 2779-2786
- Zadina J.E., Kastin A.J., Ge L.-J., Hackler L. *Mu, delta, and kappa opiate receptor binding of Tyr-MIF-1 and of Tyr-W-MIF-1, its active fragments, and two potent analogs*. *Life Sci.* (1994), **55**: 461-466
- Zadina J.E., Martin-Schild S., Gerall A.A., Kastin A.J., Hackler L., GE L.J., Zhang X. *Endomorphins: novel endogenous mu-opiate receptor agonists in regions of high mu-opiate receptor density*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1999), **897**: 136-144

