

POLSKA AKADEMIA NAUK

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



**Analiza efektu przeciwbólowego nowych
analogów neuropeptydów w mysim modelu
bólu nowotworowego**

Anna Leśniak

Rozprawa doktorska

wykonana w Zakładzie Neuropeptydów

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

Warszawa, 2013

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:

Panu prof. dr hab. n. med. Andrzejowi Lipkowskiemu za podjęcie się roli promotora pracy oraz za opiekę merytoryczną, cenne rady i wskazówki na każdym etapie wykonywania pracy

Paniom prof. dr hab. n. med. Janinie Rafałowskiej oraz dr n. biol. Hannie Szymańskiej za pomoc w wykonaniu i interpretacji badań histologicznych

Panom prof. Gézie Tóth oraz dr Sándorowi Benyhe za użyczenie radioligandów oraz pomoc w badaniach radioizotopowych

Panu dr hab. Mariuszowi Sacharczukowi za pomoc w badaniach farmakologicznych

a także

Koleżankom i Kolegom z Zakładu Neuropeptydów IMDiK PAN za wsparcie i stworzenie miłej atmosfery pracy

Anna Leśniak

SPIS TREŚCI:

1. WSTĘP	9
1.1 Funkcja i definicja bólu.....	9
1.2 Fizjologia bólu	9
1.3 Charakterystyka i funkcja receptorów opioidowych.....	16
1.4 Endogenne ligandy receptorów opioidowych	21
1.5 Mechanizmy hamowania bólu przez związki opioidowe	26
1.6 Mechanizm analgezji obwodowej.....	35
1.7 Ból nowotworowy	38
1.7.1 Klasyfikacja i etiologia bólu nowotworowego.....	38
1.7.2 Farmakoterapia bólu nowotworowego.....	43
2. CELE PRACY:	50
3. MATERIAŁY I METODY.....	52
3.1 Doświadczenia radioizotopowe	52
3.1.2 Przygotowanie homogenatu z mózgu szczura	52
3.1.3 Kompetycyjne wiązanie radioizotopowe	53
3.1.4 Analiza [³⁵ S]GTPγS	54
3.2 Doświadczenia <i>in vitro</i>	54
3.2.1 Hodowla komórek czerniaka linii B16F0	54
3.2.2 Test przeżywalności komórek.....	55
3.3 Doświadczenia <i>in vivo</i>	56
3.3.1 Zwierzęta	56
3.3.2 Implantacja komórek czerniaka linii B16F0.....	56
3.3.3 Preparatyka mikroskopowa.....	57
3.3.4 Test podeszwowy oraz test cofania ogona	58
3.3.5 Pomiar rozwoju termicznej hiperalgezji	59
3.3.6 Pomiar objętości kończyny	59
3.3.7 Doświadczenia farmakologiczne	59
3.4 Związki użyte w doświadczeniach <i>in vivo</i>	60
3.5 Statystyczna analiza wyników	61

4. WYNIKI	61
4.1 Charakterystyka morfologiczna i behawioralna mysiego modelu bólu nowotworowego.....	61
4.2 Farmakodynamika bifaliny i peptydów 5320 oraz 5311 w kompetycyjnych i funkcjonalnych badaniach radioizotopowych	72
4.3 Działanie analgetyczne bifaliny i peptydów 5320 oraz 5311 w teście podszwowym	78
4.4 Działanie analgetyczne bifaliny i peptydów 5320 oraz 5311 w teście cofania ogona	89
4.5 Porównanie udziału analgezji ośrodkowej i obwodowej bifaliny i peptydów 5320 oraz 5311.....	94
4.6 Rozwój tolerancji na bifalinę, peptyd 5320 oraz morfinę	98
5. DYSKUSJA.....	102
6. WNIOSKI	119
7. STRESZCZENIE.....	120
8. ABSTRACT	123
9. LITERATURA	128

SPIS SKRÓTÓW

%MPE – % maksymalnego możliwego efektu analgetycznego

[³⁵S]GTPγS – guanozyna 5-O- [γ-³⁵S]-trifosforan

5-HT – 5-hydroksytryptamina

5-HT₂ – receptor serotoninerdyczny - 2

AMPA – kwas α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolo-propionowy

ANOVA – analiza wariancji

ASIC – kanał aktywowany protonami

AUC – pole powierzchni pod krzywą

B1 – receptor dla bradykininy - 1

BAM – bydlęcy peptyd rdzenia nadnerczy

BBB – bariera krew-mózg

BK – bradykinina

CaMK – kinaza zależna od jonów wapnia i kalmoduliny

cAMP – cykliczny 3',5'- adenozynomonofosforan

CCK – cholecystokinina

cGMP – cykliczny 3'5'-guanozynomonofosforan

CGRP – peptyd związany z genem kalcytoniny

COX-2 – cyklooksygenaza 2

CREB – białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP

DALDA – amid [D-Arg², Lys⁴] (1-4) dermorfiny

DAMGO – (D-Ala²,_{NMe}Phe⁴, Gly⁵-ol)enkefalina

DELTA II – tyrosyl-3,5-3H]deltorfina II

DPDPE – [D-Pen², D-Pen⁵]enkefalina

DSLET – D-Ser²-Leu-enkefalina-Thr⁶

EAA – aminokwasy pobudzające

EAPC – Europejskie Stowarzyszenia Opieki Paliatywnej

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

ERK 1 i 2 – kinaza zależna od sygnału zewnątrzkomórkowego 1 i 2

FBS – bydlęca surowica płodowa

GABA – kwas γ -aminomasłowy
GDP – guanozyna-5'-difosforan
GIRK – sprzężone z białkiem G wewnątrzprzewodnicze kanały potasowe
GPCR – receptory sprzężone z białkiem G
GTP – guanozyna-5'-trifosforan
IASP – Międzynarodowe Stowarzyszenie Badania Bólu
IL-1 β – interleukina - 1 β
IL-2 – interleukina -2
IP₃ – inozytolotrifosforan
KAR – receptor kainianowy
LC – jądro sinawe pnia mózgu
LNAAT – transporter dużych obojętnych aminokwasów
LOX – lipooksygenaza
LT – neuron o niskim progu pobudzenia
M3G – morfino-3-glukuronian
M6G – morfino-6-glukuronian
MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenami
mGluR – metabotropowy receptor glutamatergiczny
NK-1 – neurokinina-1
NKA – neurokinina A
NLPZ – niesterydowe leki przeciwzapalne
NLX – naltrekson
NLXM – metylojodek naloksonu
NMDA – kwas N-metylo-D-asparaginowy
NO – tlenek azotu
NOS – syntaza tlenku azotu
NRM – jądro wielkie szwu
NS – neurony nocyceptywne
NTDDS – System Celowanego Dostarczenia Leku do Neuronu
ORL1 – receptor opioidopodobny - 1
OUN – ośrodkowy układ nerwowy

P75 NGF – receptor dla neurotrofiny p75
PAG – substancja szara okołowodociągowa
PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanami
(pre-) PDYN – (pre-) prodynorfina
(pre-) PENK – (pre-) proenkefalina
PEI – polietyloimina
PG – prostaglandyna
PKA – kinaza białkowa A
PKC – kinaza białkowa C
PLA2 – fosfolipaza A2
PLC – fosfolipaza C
(pre-) PNOC – (pre-) pronocyceptyna
(pre-) POMC – (pre-) proopiomelanokortyna
PPT – preprotachykinina
PTX – toksyna krztuścowa
RM ANOVA – analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami
RT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy z przyrostem produktu w czasie rzeczywistym
RVM – brzuszno-dogłowa część rdzenia przedłużonego
SP – substancja P
TRKA – kinaza tyrozynowa A
TRP – kanał jonowy aktywowany przejściowym potencjałem
TRPV1 – receptor waniloidowy-1
TRPV4 – receptor waniloidowy-4
TTX – tetrodotoksyna
VGCC – zależny od napięcia kanał wapniowy
VPL – jądro brzuszne tylnoboczne
WDR – neuron konwergencyjny
WHO – Światowa Organizacja Zdrowia

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. WSTĘP

1.1 Funkcja i definicja bólu

Ból jest zjawiskiem towarzyszącym człowiekowi od zarania dziejów a opisy tego zjawiska sięgają czasów starożytnego Egiptu i Babilonu. Słowo "ból" pochodzi od łacińskiego wyrazu „poena” oznaczającego karę. Ból ostry jest zjawiskiem nieodłącznie związanym z życiem człowieka, gdyż sygnalizuje zagrożenie dla integralności i homeostazy organizmu. Biologiczna, czyli ostrzegawcza funkcja bólu prowadzi do wytworzenia silnych skojarzeń z zewnętrznym bądź wewnętrznym uszkodzeniem, niezależnie od tego czy dane okoliczności jego wystąpienia je sugerują. Umożliwia to utrzymanie homeostazy w ustroju oraz przystosowuje organizm do podjęcia działania - "walcz lub uciekaj". Uporczywy, przewlekły ból jest schorzeniem samym w sobie i często staje się przyczyną innych jednostek chorobowych takich jak np. depresja. Niewątpliwie ból jest więc także zjawiskiem psychicznym oraz emocjonalnym co nadaje mu subiektywnego charakteru. W 1979 roku Międzynarodowe Stowarzyszenie Badania Bólu (IASP- *International Association for the Study of Pain*) podjęło próby zdefiniowania bólu w ujęciu klinicznym jako: nieprzyjemne, zmysłowe i emocjonalne przeżycie towarzyszące istniejącemu lub zagrażającemu uszkodzeniu tkanki, bądź odnoszone do takiego uszkodzenia.

Terapia bólu jest obecnie jednym z wyzwań nowoczesnej medycyny. Szczególnie ból przewlekły o podłożu nowotworowym jest obiektem zmagania naukowców i klinicystów. Prowadzone badania nad poszukiwaniem nowych analgetyków w terapii bólu nowotworowego mają kluczowe znaczenie dla poprawy jakości życia pacjenta oraz zachowania jego aktywności społecznej.

1.2 Fizjologia bólu

W zjawisko odczuwania bólu zaangażowane są liczne mechanizmy, które składają się na cztery podstawowe procesy: transdukcji, transmisji, modulacji oraz percepcji. Transdukcja związana jest bezpośrednio z aktywacją obwodowych wolnych zakończeń włókien dośrodkowych neuronów czuciowych (nocyceptorów) i przekształcenie bodźca uszkodzającego w impuls elektrofizjologiczny. Istnieją trzy typy nocycceptorów

w zależności od bodźca, który je pobudza. Należą do nich termoreceptory reagujące na zmiany temperatury, mechanoreceptory reagujące na bodźce mechaniczne oraz chemoreceptory odpowiedzialne za odbieranie bodźców chemicznych. Działanie bodźca uszkodzającego prowadzi do uwolnienia obwodowych mediatorów pełniących rolę aktywatorów nocycceptorów oraz inicjatorów reakcji zapalnej. Należą do nich wewnątrzkomórkowe jony H^+ i K^+ , prostaglandyny (PG) oraz bradykinina (BK) uwolnione w procesie lizy błon komórkowych lub naczyń krwionośnych. Komórki zwojowe będące ciałami neuronów czuciowych, w warunkach sensytyzacji nocycceptorów obwodowych syntetyzują neuropeptydy głównie substancję P (SP), cholecystokininę (CCK) oraz peptyd związany z genem kalcytoniny (CGRP). Transportowane są one do miejsca uszkodzenia i odpowiadają za dalsze pobudzenie wydzielania BK oraz histaminy z komórek tucznych, serotoniny z płytek krwi a także cytokin prozapalnych potęgując proces zapalny. Ciągłe pobudzenie nocycceptorów skutkuje pojawieniem się zjawiska sensytyzacji obwodowej, z którą związane jest zjawisko hiperalgezji termicznej bądź mechanicznej. Proces ten wiąże się z obniżeniem progu bólowego skutkującym silniejszym niż w warunkach fizjologicznych odczuwaniem bólu po stymulacji bodźcami termicznymi bądź mechanicznymi. Zjawisko hiperalgezji występujące w miejscu uszkodzenia nosi nazwę hiperalgezji pierwotnej. Jednakże oprócz zwiększenia się wrażliwości skóry na bodźce bólowe w miejscu uszkodzenia tkanki, rozszerza się także obszar nadwrażliwości w miejscach dookoła uszkodzenia. Proces ten opisywany jest jako hiperalgezja wtórna (Coutaux 2005). Transdukcja bodźców uszkodzających przez nocycceptory możliwa jest dzięki obecności w ich błonie różnego rodzaju receptorów takich jak: receptory z rodziny kanałów jonowych aktywowanych przejściowym potencjałem (TRP) w tym waniloidowy TRPV1 wrażliwy na temperaturę, kapsaicynę i protony, receptory purynergiczne, muskarynowe, serotoninowe 5-HT₃, bradykininowe, nikotynowe, kinazy tyrozynowej A (TRKA) oraz kanałów jonowych Na^+ i K^+ oraz niezależnych od napięcia kanałów aktywowanych protonami (ASIC) (Lewin i Moshourab 2004; Sommer 2004; Tominaga i Caterina 2004; Mizmura i wsp. 2005; Burnstock 2009).

Impulsy elektryczne w bólu fizjologicznym są przewodzone na drodze transmisji przez dwa typy włókien dośrodkowych: A δ oraz C zwanych również włóknami

"bólowymi". Każde z tych rodzajów włókien posiada inne właściwości pozwalające im na przewodzenie różnych rodzajów informacji nocycytywnej. Nocycyptory włókien typu A δ oraz C posiadają dość wysoki próg aktywacji, co oznacza, że tylko intensywne, uszkodzające bodźce są w stanie pobudzić receptor (Campbell i wsp. 1989; Light i wsp. 1993). Włókna A δ o średnicy 1-5 μ m są skąpo zmielinizowane, co czyni je włóknami przewodzącymi informację z szybkością 5-30m/s. Odpowiadają one zarówno na bodźce mechaniczne jak i termiczne a informacja nimi przewodzona odbierana jest jako szybki, kłujący ból. Włókna typu C należą do najmniejszych włókien niezmielinizowanych wolnoprzewodzących (poniżej 3m/s) osiągających średnicę poniżej 1,5 μ m. Nocycyptory włókien typu C należą do receptorów polimodalnych reagujących na szerokie spektrum uszkodzających bodźców zarówno mechanicznych, termicznych i chemicznych (Perl 1996; Cain i wsp. 2001). Włókna te odpowiedzialne są za odczuwanie powolnego, piekącego bólu, trudnego do jednoznacznego zlokalizowania ze względu na rozległe usieciowanie włókien. Trzeci typ włókien A β odpowiedzialny jest za czucie dotyku i nie mają one wpływu na powstawanie odczuć bólowych w warunkach fizjologicznych. Wysokozmielinizowane włókna, o dużej średnicy (4-12 μ m), posiadają niski próg pobudzenia i pozwalają na szybkie przewodzenie potencjałów czynnościowych z prędkością 50-70m/s. Włókna tego typu zaangażowane są jednak w mechanizm odczuwania bólu patologicznego np. neuropatycznego, gdzie w wyniku uszkodzenia nerwu obwodowego pojawia się zjawisko allodynii, czyli przeculicy na niebólowe bodźce mechaniczne lub termiczne.

Aksony neuronów czuciowych znajdują swoje zakończenie w rogach tylnych rdzenia kręgowego będącego pierwszym punktem modulacji oraz pierwszym piętrzem przetwarzania informacji nocycytywnej. Rogi tylne rdzenia kręgowego składają się z 10 warstw w czym 6 z nich należy do układu czuciowego. Włókna typu C dochodzą jedynie do warstw I i II, gdzie tworzą synapsy bezpośrednio z neuronami projekcyjnymi nocycytywymi (NS). W warstwie II aksony włókien C tworzą także synapsy z neuronami wstawkowymi pobudzającymi (glutaminergicznymi) lub hamującymi (GABA-ergicznymi, glicynergicznymi i enkefalinergicznymi), które to z kolei tworzą połączenia z neuronami konwergencyjnymi (WDR) w warstwie V. Neurony wstawkowe mają za zadanie wzmacniać lub hamować odpowiedź neuronów NS i WDR wpływając

na modulację informacji nocyceptywnej przekazywanej dalej do wyższych pięter układu nerwowego. Większość włókien A δ posiada swoje zakończenia w wierzchniej warstwie I i II tworząc, podobnie jak włókna C, połączenia z neuronami NS. Włókna te dochodzą także do głębszych warstw IV, V i VI tworząc bezpośrednio synapsy z neuronami WDR. Włókna A β unerwiają natomiast głównie głębsze warstwy III-V i tworzą synapsy z neuronami o niskim progu pobudzenia (LT) przewodzącymi nieuszkodzające bodźce dotykowe oraz z neuronami WDR (Mello i Dickenson 2008). Neurony WDR pobudzone są szerokim zakresem bodźców, od lekkiego dotyku do bodźców uszkodzających, zarówno termicznych, mechanicznych czy chemicznych o szerokim zakresie natężenia. Synapsy utworzone w rogach tylnych rdzenia kręgowego pomiędzy aksonem pierwotnych włókien dośrodkowych (błona presynaptyczna) a neuronem projekcyjnym (błona postsynaptyczna) są miejscem oddziaływań wachlarza neurotransmiterów z receptorami czego wynikiem jest modulacja informacji nocyceptywnej (Furst 1999). Do receptorów zlokalizowanych zarówno w błonie presynaptycznej jak i postsynaptycznej należą min. receptory NK-1, receptory opioidowe, serotoninowe 5-HT₂ i 5-HT₃, α -adrenergiczne oraz GABA. Receptory te biorą udział zarówno w przewodzeniu jak i modulacji bodźców bólowych i są także potencjalnym miejscem działania leków przeciwbólowych. Wskutek przesuwania się potencjału czynnościowego wzdłuż aksonu następuje napływ Ca²⁺ przez zależne od napięcia kanały wapniowe (VGCC) w błonie presynaptycznej i uwolnienie neuroprzebieżników zmagazynowanych w pęcherzykach presynaptycznych. Do jednych z głównych neuroprzebieżników należą min. aminokwasy pobudzające (EAA): glutaminian i asparaginian a także SP i neurokinina A (NKA). Substancje te wydzielane są do szczeliny międzysynaptycznej, gdzie wiążą się z właściwymi receptorami postsynaptycznymi. EAA aktywują receptory jonotropowe dla kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolo-propionowego (AMPA), kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA), receptory kainianowe (KAR) a także metabotropowe receptory mGluR dla glutaminianu (Dingledine i wsp. 1999). Receptory AMPA i KAR odpowiadają za nagły napływ jonów Na⁺ i szybką depolaryzację błony komórkowej neuronów dzięki czemu uczestniczą w aktywacji bramkowanego napięciem i zależnych od liganda receptorów NMDA. Receptory NMDA przy

fizjologicznym stężeniu jonów Mg^{2+} pozostają niewrażliwe na pobudzenie glutaminianem. Otwarcie kanału NMDA następuje poprzez usunięcie blokującego kanał jonu Mg^{2+} wskutek przedłużonej depolaryzacji po związaniu glutaminianu do receptorów AMPA lub SP do receptorów NK-1. Receptor NMDA po związaniu glutaminianu zostaje otwarty co skutkuje silnym napływem jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki. Ponadto związanie glutaminianu z receptorami metabotropowymi mGluR powoduje uruchomienie wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych poprzez aktywację fosfolipazy C (PLC) i syntezę inozytolotrifosforanu (IP_3) oraz diacyloglicerolu (DAG). Inozytolotrifosforan przyczynia się do dalszego zwiększenia stężenia jonów Ca^{2+} w komórce poprzez ich uwalnianie z siateczki śródplazmatycznej. Diacyloglicerol stymuluje natomiast aktywację kinazy białkowej C (PKC), która w warunkach zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej i w środowisku wysokiej podaży Ca^{2+} prowadzi do wzmożonej ekspresji genów białek receptorowych (np. receptorów NMDA), protoonkogenów *c-fos* i *c-jun* i syntezy neuropeptydów (enkefaliny, dynorfiny, SP). Wzrost stężenia jonów Ca^{2+} prowadzi także do aktywacji innych enzymów takich jak: syntaza tlenku azotu (NOS), cyklooksygenaza 2 (COX-2), fosfolipaza A2 (PLA2), lipooksygenaza (LOX) oraz kinazy zależne od Ca^{2+} i kalmoduliny (CaMK). Inicjuje to wzmożoną syntezę prostaglandyn, tromboksanu, leukotrienów oraz tlenku azotu (NO). Tlenek azotu dyfundując wstecznie do zakończeń presynaptycznych obniża próg pobudliwości nocycceptorów, zwiększa wydzielanie glutaminianu oraz ekspresję kanałów Ca^{2+} typu N (Przeklasa-Muszynska 2006). Mechanizm aktywacji i zwiększonej ekspresji receptorów NMDA jest przyczyną pojawienia się samonapędzającego (*ang.* - *wind-up*) zjawiska uwrażliwienia neuronów rogów tylnych rdzenia kręgowego na stymulację nocycceptywną oraz utrzymanie ich wrażliwości po zakończeniu stymulacji (Herrero i wsp. 2000). Proces "wind-up" jest jedną z części składowych zjawiska ośrodkowej sensytyzacji, która prowadzi również do powstania hiperalgezji wtórnej, bólu rzutowanego oraz zjawiska pamięci bólowej.

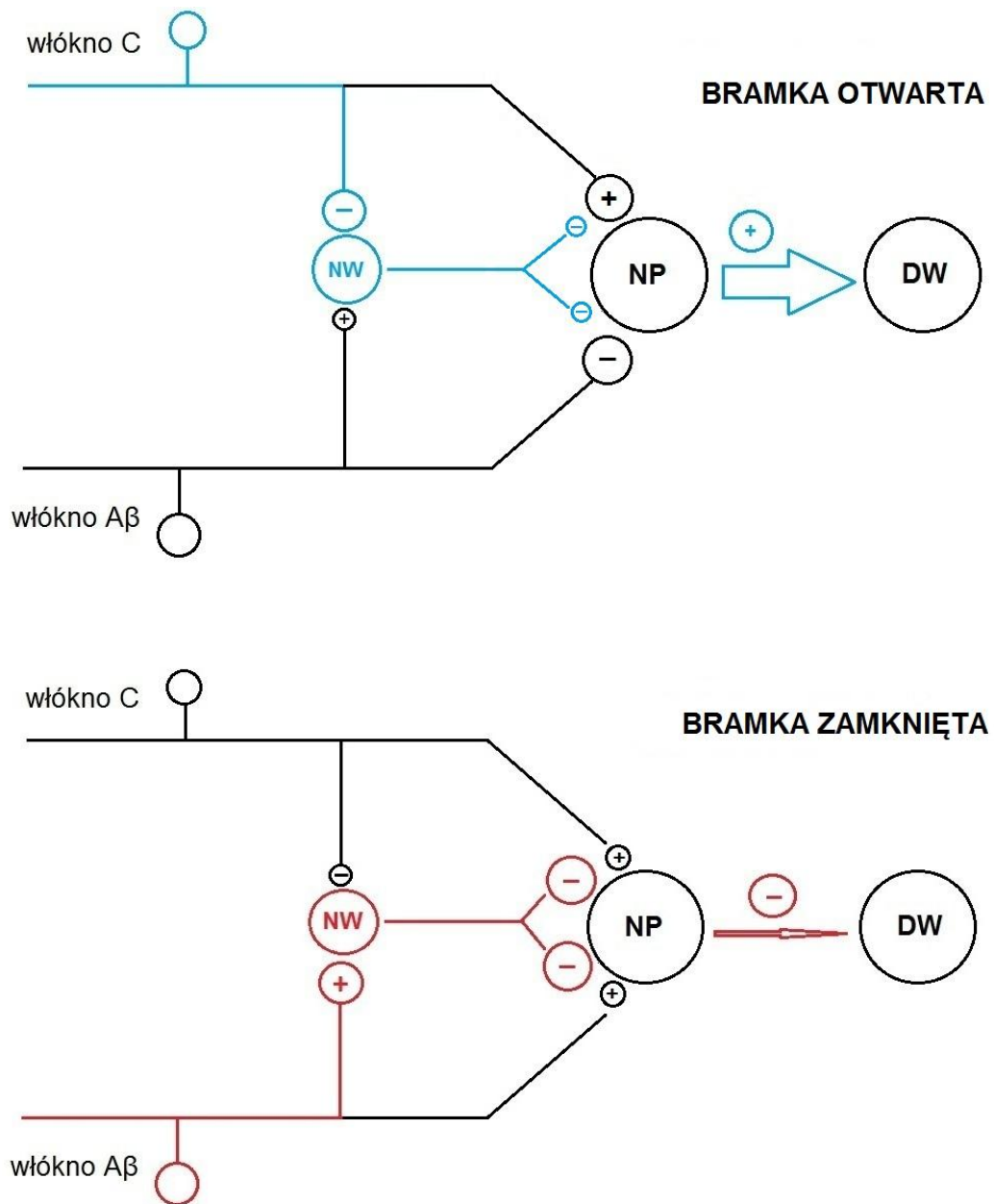
Oprócz udziału komórek nerwowych w transmisji bólowej na poziomie rogów tylnych rdzenia kręgowego, badania wskazują także na udział astro i mikrogleju w tym procesie poprzez produkcję cytokin (Uceyler i wsp. 2009). Aktywowane przez EAA, SP i NO astrocyty produkują szereg mediatorów prozapalnych wpływających na

zwiększenie przepuszczalności kanałów dla jonów Na^+ , kanałów VGCC dla jonów Ca^{2+} oraz znowelizowanie ekspresji receptorów AMPA i receptorów B1 dla bradykininy (Beattie i wsp. 2002; Cuhna i wsp. 2007; Czeschik i wsp. 2008). Ponadto cytokiny prozapalne jak IL-1 i IL-6 wzmagają wydzielanie SP (Inoue i wsp. 1999; Murphy i wsp. 1999) oraz CGRP (Hou i wsp. 2003). Informacja nocyceptywna wędruje dalej do wyższych pięter OUN drogami wstępującymi: drogą rdzeniowo-wzgórzową przyśrodkową i boczną. Aksony neuronów warstwy I i V rogów tylnych rdzenia kręgowego tworzą drogę rdzeniowo-wzgórzową boczną i przekazują informację nocyceptywną do wzgórza a następnie do kory wyspowej odpowiadającej za emocjonalne odczuwanie bólu. Neurony z głębszych warstw: II, IV-VIII wchodzi w skład szlaku rdzeniowo-wzgórzowego przyśrodkowego i przewodzą impulsy do jądra brzuszno-tylno-bocznego (VPL) wzgórza, jąder mostu, oraz podwzgórza a następnie przekazują informację do kory czuciowej. Droga ta odpowiada za jakościowe, ilościowe oraz topograficzne doświadczenie bólu a także inicjuje zachowania organizmu prowadzące do ochrony uszkodzonej tkanki. Szlak rdzeniowo-wzgórzowy przyśrodkowy tworzy połączenie z neuronami tworzącego mostu (szlak rdzeniowo-siatkowaty), których pobudzenie na skutek doznań bólowych w konsekwencji prowadzi do wystąpienia objawów ze strony wegetatywnego układu nerwowego takich jak rozszerzenie źrenic, pocenie się (Craig 2003). Neurony szlaku rdzeniowo-wzgórzowego przyśrodkowego przesyłają również informację nocyceptywną do substancji szarej okołowodociągowej (PAG) tworząc most pomiędzy bólową drogą wstępującą i zstępującą.

Działanie uszkodzającego bodźca bólowego nie zawsze wiąże się z percepcją bólu. Przekazanie informacji nocyceptywnej do wyższych pięter OUN pozostaje pod kontrolą zstępujących szlaków hamowania bólu, ograniczających aktywność neuronów projekcyjnych w rogach tylnych rdzenia kręgowego. W procesie tym biorą udział endogenne związki opioidowe oraz inne neuroprzekaźniki takie jak noradrenalina, serotonina czy GABA. Nadrzędną rolę w mechanizmie hamowania bólu w drogach zstępujących pełnią PAG w śródmózgowiu oraz brzuszno-dogłowa część rdzenia przedłużonego (RVM). Do struktur RVM należą jądra wielkie szwu (NRM) zawierające neurony serotonergiczne oraz sąsiadujące jądra brzusznej części tworzącego mostu.

Do zstępującego układu antynocyceptywnego należy także jądro sinawe pnia mózgu (LC), zawierające neurony noradrenergiczne. Aksony z PAG przekazują impulsy do jąder tworzącego siatkowatego a następnie do rogów tylnych rdzenia kręgowego, gdzie tworzą synapsy z neuronami WDR i NS. Pobudzenie RVM i LC powoduje uwolnienie serotoniny i noradrenaliny. Neurony noradrenergiczne wykazują działanie hamujące poprzez presynaptyczne receptory α_2 -adrenergiczne które poprzez zwiększenie przewodnictwa kanałów K^+ oraz hamowanie kanałów dla jonów Ca^{2+} w konsekwencji doprowadzają do zmniejszenia uwalniania przekazywanych pronocyceptywnych takich jak SP, CGRP, EAA. Aktywacja postsynaptycznych receptorów α_2 -adrenergicznych hamuje aktywność neuronów rdzenia kręgowego również w sposób pośredni poprzez aktywację neuronów serotonergicznym, cholinergicznym, enkefalinergicznym oraz GABA-ergicznym (Millan 2002).

Proces modulacji bólu ma miejsce na poziomie rogów tylnych rdzenia kręgowego według tzw. „teorii bramki kontrolnej”. W 1965 roku Malzac i Wall na bazie obserwacji, że aktywacja nocyceptorów obwodowych nie zawsze prowadzi do percepcji bólu, sformułowali teorię tzw. bramkowania bólu. Podstawowy mechanizm zakłada istnienie na poziomie rogów tylnych rdzenia kręgowego bramki kontrolnej, od otwarcia której zależy przekazanie dalej informacji nocyceptywnej. Aktywność neuronów projekcyjnych kontrolowana jest przez hamujące neurony wstawkowe redukujące dopływ do nich impulsów bólowych. Podrażnienie zmielinizowanych, grubych włókien $A\beta$ powoduje aktywację neuronu wstawkowego, który zamyka bramkę wywierając presynaptyczne działanie hamujące na aktywność neuronu projekcyjnego. Wrażenia czuciowe odbierane są więc jako bezbolesne dopóki w układzie przeważa impulsacja przewodzona przez włókna $A\alpha/A\beta$. Bolesny bodziec bólowy powoduje zwiększenie udziału impulsacji pochodzącej z włókien C, która hamuje aktywność neuronów wstawkowych, co prowadzi do otwarcia bramki i pobudzenia neuronu projekcyjnego do wzmożonego wysyłania impulsacji nocyceptywnej drogą rdzeniowo-wzgórzową (Malzac i Wall 1965) (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat bramki rdzeniowej wg. teorii Malzac'a i Wall'a. NW - neuron wstawkowy hamujący; NP - neuron projekcyjny; DW - drogi wstępujące.

1.3 Charakterystyka i funkcja receptorów opioidowych

System opioidowy jest jednym z głównych układów zaangażowanych w ewolucyjnie konserwatywne mechanizmy takie jak: modulacja bodźców bólowych, zachowania związane z odczuwaniem przyjemności, strachu oraz mechanizmów prowadzących do

uzależnienia (Herz 1998; Inturrisi 2002, Petrovic i wsp. 2008; Lehner i wsp. 2010). Istnienie receptorów opioidowych po raz pierwszy zostało udokumentowane w 1973r. w badaniach wiązania radioizotopowych ligandów opioidowych do receptorów obecnych w homogenacie mózgu szczura (Pert i Snyder 1973; Simon i wsp. 1973; Terenius 1973). Pierwsze próby sklasyfikowania receptorów podjęli Gilbert i Martin (1976) oraz Lord i współpracownicy (1977) opierając się na doświadczeniach wiązania opiatów do receptorów opioidowych zlokalizowanych w mysich nasieniowodów. We wczesnych latach 90-tych podjęto się sklonowania receptora opioidowego μ (Chen i wsp. 1993, Thompson i wsp. 1993), δ (Evans i wsp. 1992) oraz κ (Li i wsp. 1993, Yasuda i wsp. 1993; Meng i wsp. 1993). Oprócz klasycznych typów receptorów opioidowych zidentyfikowano także opioidopodobny receptor ORL1 dla nocycetyny/orfaniny FQ. Struktura i funkcja tego receptora podobna jest do klasycznych receptorów opioidowych a jego endogenny ligand wykazuje podobieństwo strukturalne do dynorfiny A. Receptor ORL1 dzieli bowiem z receptorami opioidowymi 70% homologii a także posiada zdolność hamowania cykazy adenylowej po związaniu endogenego liganda podobnego do dynorfiny A – nocycetyny (Meunier i wsp. 2002). Niemniej jednak nadal uważa się go za receptor nietypowy ze względu na odmienny profil farmakologiczny po związaniu liganda. Udowodniono, że agoniści wykazujący wysokie powinowactwo do pozostałych trzech typów receptorów opioidowych wykazują bardzo słabe wiązanie do receptora ORL1 (Bunzow i wsp. 1994).

Receptory opioidowe należą do klasy receptorów rodopsynopodobnych, nadrodziny receptorów metabotropowych związanych z białkiem G (GPCR), posiadających siedem domen przezbłonowych, trzy pętle zewnętrzne i wewnątrzkomórkowe oraz zewnątrzkomórkowy C-koniec i wewnątrzkomórkowy N-koniec (Fukuda i wsp. 1993). W procesie wiązania liganda biorą udział V-VII domeny przezbłonne w przypadku receptora δ , w receptorze μ funkcję tę spełnia pętla zewnątrzkomórkowa I a w receptorze κ , pętla zewnątrzkomórkowa II i domena przezbłonna IV. Pierwsza i trzecia pętla wewnątrzkomórkowa, domena V oraz C-koniec odpowiedzialne są za uruchomienie wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Mimo, że receptory opioidowe kodowane są przez różne geny oraz występują w wielu wariantach wykazują 60% homologii (Chaturvedi 2000) dzięki potranskrypcyjnym modyfikacjom mRNA (Wei

i wsp. 2004; Wei i Loh 2011). Najwyższą homologię zaobserwowano w domenach przezbłonowych i pętlach wewnątrzkomórkowych. Największą zmienność sekwencji wykazują natomiast C i N-koniec oraz pętle zewnątrzkomórkowe co przekłada się na unikalne właściwości farmakologiczne różnych typów receptorów (Akil i wsp. 1996; Pil i Tytgat 2003). Dodatkowo za właściwości te odpowiedzialny może być także proces oligomeryzacji i heterodimeryzacji receptorów (Bouvier 2001; Rios i wsp. 2001; Levac 2002; Gupta i wsp. 2006).

Receptory opioidowe występują zarówno w strukturach ośrodkowego (mózg i rdzeń kręgowy) jak i obwodowego układu nerwowego na zakończeniach nerwów czuciowych oraz w tkankach o pochodzeniu innym niż neuronalne. Rozmieszczenie poszczególnych receptorów opioidowych w mózgu człowieka jest następujące: μ - 23%, δ - 27% oraz κ - 30%. W mózgu receptory opioidowe typu μ są gęsto rozmieszczone w warstwie III i IV kory nowej, prążkowie, jądrze półleżącym, wzgórzu, hipokampie, ciele migdałowatym, jądrze pasma samotnego. Duża ich gęstość zidentyfikowana została również w PAG i jądrach szwu. Takie rozmieszczenie receptorów μ jest spójne z ich rolą w procesie percepcji bólu oraz integracji sensomotorycznej. Receptory opioidowe δ są szczególnie silnie reprezentowane w strukturach nerwowych związanych z powonieniem a także szeroko zlokalizowane w korze nowej, prążkowie, jądrze półleżącym, ciele migdałowatym, podczas gdy ich ilość we wzgórzu, podwzgórzu oraz hipokampie pozostaje ograniczona. Rozmieszczenie tego typu receptorów wskazuje na ich udział w procesach ruchowych, węchowych oraz poznawczych. W przeciwieństwie do dwóch poprzednich typów receptorów, receptory opioidowe κ w umiarkowanym stopniu występują w prążkowie, jądrze półleżącym, wzgórzu, ciele migdałowatym oraz płacie tylnym przysadki mózgowej. Receptory opioidowe κ biorą udział w percepcji bólu, funkcjach endokrynnych, oraz zachowaniach żywieniowych (Mansour i wsp. 1988). Receptorowi ORL1 przypisuje się rolę w regulacji funkcji mózgu związanych z zachowaniami instynktownymi i pamięciowymi a także emocjami oraz funkcjami sensomotorycznymi. Jego dystrybucja wskazuje także na rolę w modulacji bólu. Receptor ten, dzięki metodom hybrydyzacji *in situ*, technice RT-PCR oraz metodom autoradiograficznym zidentyfikowano w dużej liczbie w strukturach OUN głównie w hipokampie, przegrodzie, PAG, ciele migdałowatym, wzgórzu oraz podwzgórzu.

Obecny jest także w istocie szarej rogów grzbietowych i brzusznych rdzenia kręgowego oraz w tkankach obwodowych (np. układ pokarmowy, nerki, siatkówka, serce) oraz komórkach układu immunologicznego (Chen i wsp. 1994; Mollerau i wsp. 1994; Wick i wsp. 1995; Makman i Dvorkin 1997, Dumont i Lemaire 1998; Neal i wsp. 1999; Osinski i wsp. 1999).

W rdzeniu kręgowym, moście i rdzeniu przedłużonym receptory opioidowe odpowiedzialne są za modulację szlaków wstępujących oraz zstępujących szlaków hamowania bólu. Ekspresja receptorów opioidowych została udokumentowana w szlaku wstępującym w zwojach korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych, jądrze rdzeniowym nerwu trójdzielnego oraz w zstępującej drodze hamowania bólu w PAG, moście, jądrze siatkowatym pośrednim, jądrze górnym środkowym oraz jądrze wielkim szwu (Pan i wsp. 2004). Receptory opioidowe podobnie jak większość receptorów typu GPCR występują w dwóch stanach aktywności: formie aktywnej oraz nieaktywnej wykazującej jednak pewien poziom aktywności podstawowej. Ligandy modulujące aktywność receptora można podzielić w zależności od ich wpływu na jego funkcjonalność. Pełni agoniści doprowadzają receptor do formy całkowicie aktywnej. Częściowi agoniści prowadzą do zwiększenia aktywności ponad aktywność podstawową. Antagoniści blokują miejsce wiązania dla agonistów, nie wpływając na zmianę aktywności podstawowej. Odwrotni agoniści wywołują stan receptora charakteryzujący się niższą od podstawowej aktywnością (Kenakin 2002).

Oprócz udziału w procesie hamowania bólu receptory opioidowe wpływają także pośrednio na funkcje innych układów. Receptory typu μ oraz δ zaangażowane są w blokowanie wydzielania acetylocholino w mózgu (Hirokami i wsp. 1994; Gazyakan i wsp. 2000; Kearns i wsp. 2001; Sakai i wsp. 2002). Zjawisko to zostało opisane w badaniach na myszach pozbawionych receptorów opioidowych μ . W badanym modelu zaobserwowano kompensacyjny wzrost aktywności syntazy acetylocholino oraz zmniejszenie ilości receptorów muskarynowych M2 (Tien i wsp. 2004). Receptory opioidowe biorą także udział w modulacji wydzielania noradrenaliny (Jackish i wsp. 1986), wazopresyny (Wells i Forsling 1991), dynorfiny i glutaminianu (Gannon i wsp. 1992) oraz dopaminy (Smith i wsp. 1992; Ford i wsp. 2006,2007). Co więcej wykazano, że receptory opioidowe modulują procesy neurogenezy *in vitro* oraz *in vivo* (Persson

i wsp. 2003; Narita i wsp. 2006; Khurshid i wsp. 2010). Ich pobudzenie promuje także neuroprotekcję po uszkodzeniu ischemicznym *in vivo* i w warunkach hipoksji *in vitro* (Zhang i wsp. 2002, 2003; Zhao i wsp. 2006; Kawalec i wsp. 2011).

Występowanie receptorów opioidowych nie ogranicza się jednak tylko do struktur mózgu czy rdzenia kręgowego. Receptory opioidowe zlokalizowane są także w obrębie obwodowego układu nerwowego na obwodowych zakończeniach nerwów czuciowych unerwiających układ pokarmowy (Bagnol i wsp. 1997; Holzer i wsp. 2004). Receptory opioidowe zlokalizowane są także w innych nieneuronalnych tkankach np. w śródbłonku naczyń krwionośnych i serca, gdzie biorą udział w procesie kurczenia się naczyń zależnego od tlenu azotu (Stefano i wsp. 1998; Cadet i wsp. 2000; Leo i wsp. 2009). Znajdują się także w keratynocytach i fibroblastach (Bigliardi-Qi i wsp. 2004,2006; Salemi i wsp. 2005) oraz na powierzchni komórek układu immunologicznego (Bidlack i wsp. 2000; Sharp i wsp. 2006; Benard i wsp. 2008). Funkcja receptorów opioidowych w układzie pokarmowym sprowadza się do regulacji tempa pasażu treści pokarmowej, transportu płynów i elektrolitów (Sun i wsp. 1997; Gray i wsp. 2005) oraz regulacji procesów zapalnych (Philippe i wsp. 2003). Ich ekspresja w komórkach naskórka i tkanki łącznej pełni rolę w różnicowaniu, namnażaniu oraz migracji komórek w procesach gojenia się ran (Bigliardi-Qi i wsp. 2006). Receptory opioidowe znajdujące się na powierzchni komórek układu immunologicznego posiadają identyczną sekwencję jak receptory obecne w OUN (Chuang i wsp. 1994, 1995; Sedqi i wsp. 1995) i biorą udział w wielu procesach związanych z regulacją proliferacji, chemotaksji oraz apoptozy komórek układu odpornościowego. Podanie morfiny oraz enkefalin hamuje właściwości żerne makrofagów. Efekt ten jest odwracany w obecności niespecyficznych oraz specyficznych antagonistów receptorów opioidowych (Casellas i wsp. 1991; Rojavin i wsp.1993; Szabo i wsp. 1993). Opioidy hamują także produkcję przeciwciał (Bussiere i wsp. 1992; Gaveriaux-Ruff i wsp. 2003; Vassou i wsp. 2008) i proliferację limfocytów B (Zagon i wsp. 2011). Podanie agonistów receptorów opioidowych stymuluje chemotaksję monocytów, neutrofilii oraz komórek dendrytycznych (Choi i wsp. 1999; Miyagi i wsp. 2000; Sanchez i wsp. 2003; Benard i wsp. 2008) a także aktywację

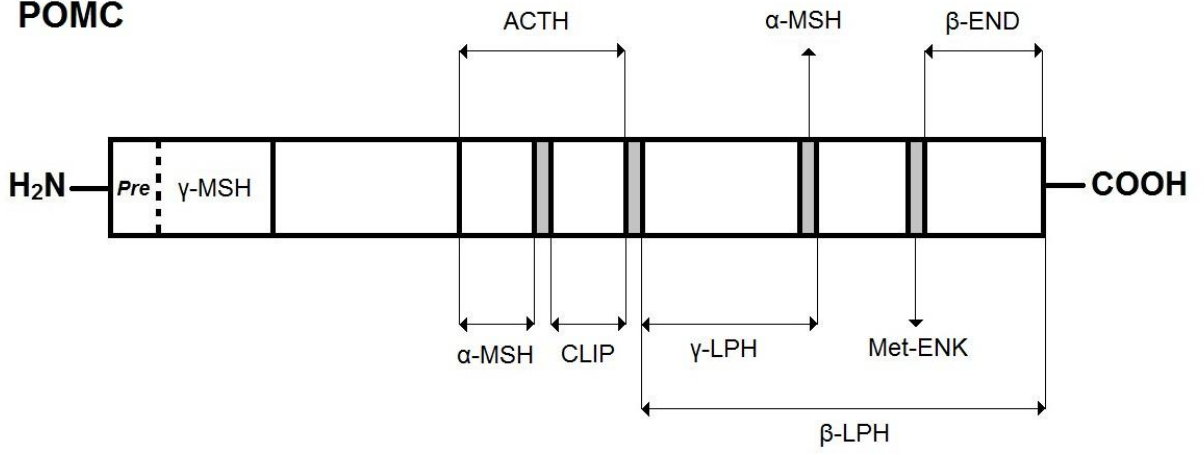
komórek NK (Puente i wsp. 1992; Boyadjieva i wsp. 2001) i proliferację limfocytów T (Bidlack i wsp. 1990).

Ze względu na swoją niekwestionowaną rolę w różnych procesach biologicznych, receptory opioidowe pozostają przedmiotem wielu badań farmakologicznych. Skupiają się one na opracowaniu substancji o działaniu przeciwbólowym, przeciwdepresyjnym czy neuroprotekcyjnym jednocześnie wywołujących mniejszą ilość działań niepożądanych.

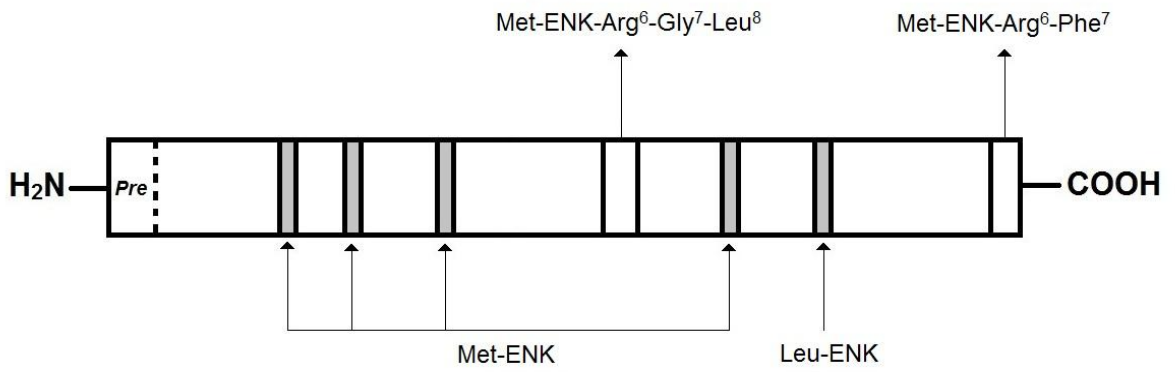
1.4 Endogenne ligandy receptorów opioidowych

Endogenne peptydy opioidowe od momentu ich odkrycia stały się nieprzerwanym obiektem badań, zmierzających w kierunku ich wykorzystania jako analgetyków w przewlekłych stanach bólowych. Były one zaraz za podwzgórzowymi neurohormonami - wazopresyną i oksytocyną, pierwszymi odkrytymi endogennymi peptydami. Badania nad endogennymi związkami, posiadającymi właściwości agonistyczne w stosunku do receptorów opioidowych, zapoczątkowało odkrycie w 1975r. enkefalin (Hughes i wsp. 1975) a następnie β -endorfiny w ekstraktach przysadki mózgowej wielbłąda (Hao i Chung 1976) oraz dynorfin (Goldstein i wsp. 1979). Cechą charakterystyczną wszystkich endogennych peptydów opioidowych jest obecność sekwencji YGGFM lub YGGFL zwanej motywem opioidowym na N-końcu łańcucha peptydowego. Prekursory endogennych peptydów opioidowych powstają z białek prekursorowych, będących produktami genów pre-proopiomelanokoryny (pre-POMC), pre-proenkefaliny (pre-PENK), pre-prodynorfiny (pre-PDYN) oraz pre-pronocyceptyny (pre-PNOC) (Ryc. 2)(Tab. 1).

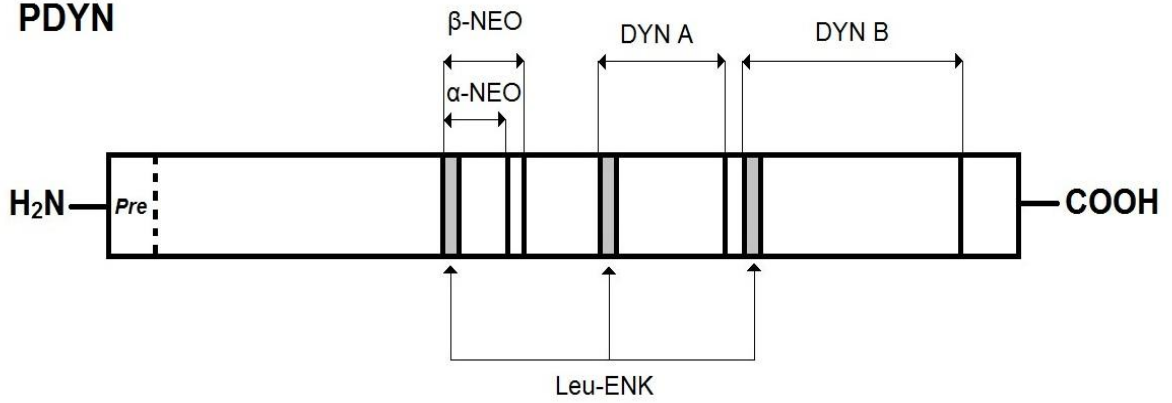
POMC

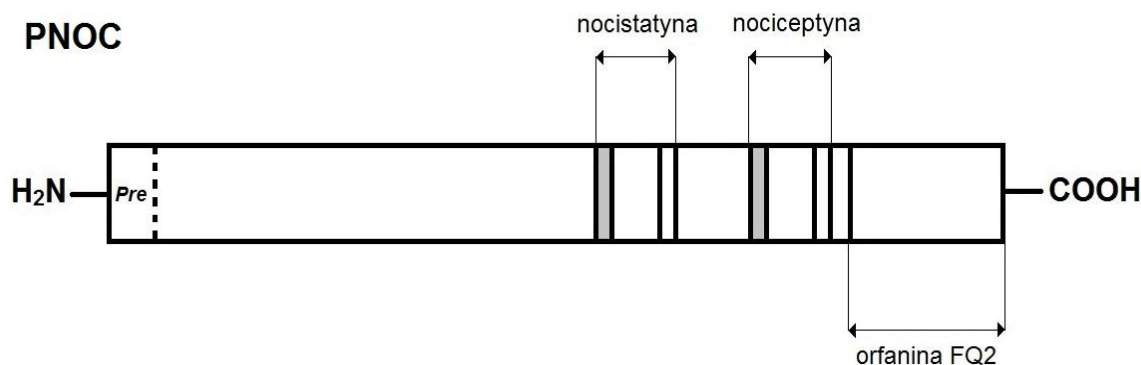


PENK



PDYN





Ryc. 2. Prekursory endogennych peptydów opioidowych i hormonów (za Chadzinska 2007).

Biologicznie aktywne peptydy opioidowe oraz nociceptyna powstają w wyniku cięcia prekursora, najczęściej w miejscach bogatych w aminokwasy zasadowe przy udziale zależnych od Zn^{2+} metaloproteinaz: enkefalinazy i aminopeptydazy N. Peptydami opioidowymi powstającymi z cząsteczki prekursorowej POMC są endorfiny, a jednym z głównych jest β -endorfina. Peptydy opioidowe wywodzące się z POMC wykazują wysokie powinowactwo w stosunku do receptorów μ i δ , syntetyzowane są w przysadce oraz występują w jądrze łukowatym podwzgórza i jądrze pasma samotnego (Khachaturian i wsp. 1985). Źródłem endorfin lub POMC są także tkanki obwodowe takie jak jelita (Ambinder i Schuster 1979), macica (Reinthaller i Riss 1985) oraz limfocyty T i B (Smith i wsp. 1985) a także niektóre nowotwory jak czerniak (Slonimski i wsp. 1993). Proteolityczne cięcie PENK prowadzi do powstania czterech cząsteczek [Met]enkefaliny, dwóch wydłużonych cząsteczek [Met]enkefaliny oraz jednej cząsteczki [Leu]enkefaliny będących ligandami receptora δ . Oprócz powinowactwa do receptora δ wykazują również powinowactwo do receptorów μ . Neurony PENK-pozytywne znajdziemy min. w podwzgórzu, prążkowie, korze mózgowej, przysadce, układzie limbicznym oraz rdzeniu kręgowym (Shivers i wsp. 1986) a także w fibroblastach i keratynocytach (Slonimski i wsp. 2011) jak i zróżnicowanych osteoblastach (Seitz i wsp. 2010). Endogenne enkefaliny i ich pochodne są w kręgu zainteresowania jako potencjalne analgetyki, gdyż wykazują silnie działanie analgetyczne w różnych modelach chronicznego bólu takich jak ból

nowotworowy (Moulin i wsp. 1985), zapalny (Yang i wsp. 2008) czy neuropatyczny (Hao i wsp. 2003; Xu i wsp. 2008). W chwili obecnej trwają badania II fazy klinicznej nad związkiem zwanym enkefaliną NP2, której gen niesiony przez wektor dostarczany jest do komórek zwojowych, gdzie ulega ekspresji. System ten jest rodzajem terapii celowanej pod nazwą NTDDS (ang. Nerve Targeting Drug Delivery System) (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01291901>). Innymi produktami powstającymi z PENK prezentującymi właściwości agonistyczne w stosunku do receptorów opioidowych są m.in.: adrenorfina (Weber i wsp. 1983), amidorfina (Seizinger i wsp. 1985), peptydy bydłęcego rdzenia nadnerczy: BAM-18 (Hurlbut i wsp. 1987), BAM-20P, BAM-22P (Mizuno i wsp. 1980). Polipeptyd PDYN jest głównym źródłem [Leu]enkefaliny, jest także prekursorem dynorfiny A i B, rimorfiny, α - i β - neoendorfiny oraz leumorfiny (Ghazarossian i wsp. 1980; Kakidani i wsp. 1982).

Peptydy opioidowe pochodzące z PDYN występują szczególnie licznie w podwzgórzu, prążkowie, PAG, układzie limbicznym, przysadce i rdzeniu kręgowym (Goldstein i Ghazarossian 1980). Przejawiają swój efekt analgetyczny poprzez wiązanie się do receptorów typu κ wykazując jednak pewne powinowactwo do receptorów μ i δ oraz receptorów NMDA (Kanemitsu i wsp. 2003). Prekursor nocyceptyny PNOC wykazuje homologię strukturalną do innych prekursorów peptydów opioidowych w szczególności do PDYN i PENK (Nothacker i wsp. 1996). Włókna nerwowe zawierające nocyceptynę zlokalizowane są głównie w warstwie II i III rdzenia kręgowego, PAG, miejscu sinawym, jądrze podwzgórzowym brzuszno-bocznym, ciele migdałowatym oraz jądrze rdzeniowym nerwu trójdzielnego (Witta i wsp. 2004). Nocyceptyna obok działania antynocyceptywnego wykazuje także właściwości znoszące analgetyczne działania opioidów bez wiązania się z ich receptorami (Xu i wsp. 1996). Znosi bowiem działanie analgetyczne morfiny podanej miejscowo do struktur takich jak PAG i RVM, zaangażowanych w przekazywanie bólowe nie wykazując jednak tolerancji krzyżowej z morfiną (Hao i wsp. 1997; Pan i wsp. 2000). Podana wprost do rdzenia kręgowego wywołuje niezależne od opioidów działanie antynocyceptywne (Grisel i wsp. 1996), jednak podanie do komory bocznej mózgu skutkuje wystąpieniem hiperalgezji spowodowanej hamowaniem wydzielania endogennych peptydów opioidowych (Mogil i wsp. 1996; Wagner i wsp. 1998).

Fakt, że dotychczasowo odkryte endogenne peptydy opioidowe nie wykazują selektywności w stosunku do jednego typu receptora, zrodziło pytanie, czy istnieją peptydy opioidowe odznaczające się taką selektywnością. Podczas badań nad właściwościami atypowego peptydu opioidowego Tyr-W-MIF-1 wyizolowanego z kory czołowej była zauważono, iż z całej rodziny podobnych peptydów, wyżej wymieniony odznaczał się najwyższą selektywnością w stosunku do receptora μ . Zamiana Gly⁴ na Phe⁴ na C-końcu łańcucha peptydowego zaowocowała uzyskaniem silnego, selektywnego agonisty receptora μ_2 endomorfiny - 1 (Zadina i wsp. 1997). Dalsze badania potwierdziły występowanie tego peptydu w korze mózgowej, wzgórzu, podwzgórzu i prążkowiu a także doprowadziły do zidentyfikowania μ_1 selektywnego agonisty endomorfiny - 2. Mimo, że znaleziona w OUN, jej głównym miejscem lokalizacji jest rdzeń przedłużony i rogi tylne rdzenia kręgowego (Martin - Schild i wsp. 1998; Shreff i wsp. 1998). Jak dotąd nie udało się zidentyfikować prekursora endomorfina. Część badań podważa nawet jego obecność i możliwość jego syntezy *de novo* (Terskiy i wsp. 2007; Ronai i wsp. 2009). Endomorfiny wykazują silne właściwości przeciwbólowe w szeregu modelach zwierzęcych bólu ostrego, zapalnego oraz neuropatycznego, hamując wydzielanie cytokin prozapalnych (Przewlocki i wsp. 2006; Jessop i wsp. 2010).

Tabela 1 Zestawienie sekwencji aminokwasowych endogennych peptydów opioidowych (Fichna i Janecka 2004).

Prekursor	Peptyd	Sekwencja
POMC	β -endorfina (1–31)	YGGFMTSEKSQTPLVTLFKNAIIKNAYKKGE
	γ -endorfina	YGGFMTSEKSQTPLVTL
	α -endorfina	YGGFMTSEKSQTPLVT
PENK	[M]-enkefalina	YGGFM
	[L]-enkefalina	YGGFL
	Morfamid	YGGFMRRV-NH ₂
	peptyd F	EQLLKALEFLLKELLEKL
	peptyd E	YGGFMRRVGRPEWWMDYQKRYGGFL
	BAM 22	YGGFMRRVGRFEWWMDYQKRYG
	BAM 20	YGGFMRRVGRFEWWMDYQKR
	BAM 18	YGGFMRRVGRFEWWMDYQ
BAM 12	YGGFMRRVGRFE	
PDYN	dynorfina A (1–17)	YGGFLRRIRFKLKWDNQ
	dynorfina B (1–13)	YGGFLRRQFKVVT
	leumorfina	YGGFLRRQFKVTRSQEDPNAYSSELFDA
	α -neo-endorfina	YGGFLRKYFK
	β -neo-endorfina	YGGFLRKYF
PNOC	nocyceptyna	FGGFTGARKSARKLANQ
	orfanina FQ2	FSEFMRQYLVLMSMQSSQ
	nocistatyna	EQKQLQ

1.5 Mechanizmy hamowania bólu przez związki opioidowe

Receptory opioidowe współpracują z wrażliwym na toksynę krztuscową (PTX) hamującym regulatorowym białkiem G_i/G₀ choć postuluje się również udział niewrażliwych na PTX białek G_z w procesie przekazywania sygnału po związaniu agonisty receptora opioidowego (Sellely i wsp. 1998). Białko G jest trimerym zbudowanym z podjednostek α , β i γ . W momencie związania agonisty następuje zmiana konformacji receptora na skutek modyfikacji wiązań między przezbłonowymi helisami stabilizującymi jego strukturę (Kobilka i Deupi 1997). Szczególną rolę w przeniesieniu sygnału pełni trzecia pętla wewnątrzkomórkowa receptora, która bezpośrednio uczestniczy w wiązaniu i aktywacji białka G (Watanabe i wsp. 2004). Po

zmianie konformacji receptora dochodzi do uwolnienia związanego z podjednostką α difosforanu guanozyny (GDP) i podstawienie w jego miejsce trifosforanu guanozyny (GTP). Następnie dochodzi do rozpadu białka G na dwie aktywne podjednostki: α oraz kompleks $\beta\gamma$, które modulują aktywność specyficznych białek docelowych. Jednym ze znaczących efektów jest hamowanie aktywności cykazy adenylowej i zmniejszenie syntezy 3',5'-cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP) (Koski i Kee 1981; Liu i wsp. 2001). Postuluje się jednak że w rozwoju tolerancji następuje aktywacja receptorów związanych z białkami G_s i wzrost cAMP. (Crain i Shen 1990). Ponadto w eksperymentach z udziałem komórek F-11 pochodzących od komórek zwojowych zaobserwowano spowodowany opioidami wzrost poziomu cAMP poprzez uruchomienie białka G wrażliwego na toksynę cholery (Cruciani i wsp. 1993). Opisuje się także, że niektóre receptory wpływają na aktywność PLC zwiększając poziom IP_3 (Smart i wsp. 1994; Joshi i wsp. 1999; Chakrabarti i wsp. 2003). Obok bezpośredniego działania na wtórne systemy wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału opioidy wpływają także na przewodnictwo jonowe. Blokują bowiem kanały jonowe zależne od Ca^{2+} typu N i L zmniejszając poziom wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} (Steward i wsp. 1991; Lin i wsp. 1992; Talent i wsp. 1994; Piros i wsp. 1996), oraz hamują wewnątrzprostownicze, sprzężone z białkiem G kanały K^+ (GIRK) (Ma i wsp. 1995; Henry i wsp. 1995; Marker i wsp. 2005). Kluczową rolę w tym procesie odgrywają kinazy białkowe: kinaza białkowa A (PKA), kinaza białkowa C PKC, kinaza białkowa CaMK oraz kinazy białkowe MAPK (ERK1 i ERK2) (Li i wsp. 1996; Belcheva i wsp. 2005; Eisinger i Ammer 2008). W wyniku ich działania dochodzi do aktywacji wielu czynników transkrypcyjnych np. fosforylacji wewnątrzkomórkowych białek CREB biorących udział w regulacji ekspresji genów związanych z uzależnieniem (Bilecki i Przewlocki 2000). Podjednostki białka G pozostają aktywne tylko przez określony czas. Posiadają one bowiem wewnętrzną enzymatyczną zdolność do hydrolizy GTP do GDP przez podjednostkę α . Konsekwencją tej reakcji jest ponowne przyjęcie przez białko G formy nieaktywnego trimeru.

Modulacja nocycepcji naddrdzeniowej przez opioidy odbywa się poprzez struktury tworzące zstępujący szlak hamowania bólu, w skład którego wchodzi PAG, RVM oraz rogi tylne rdzenia kręgowego. W literaturze istnieje wiele dowodów na zaangażowanie neuronów w PAG w naddrdzeniowy efekt analgetyczny wywołany poprzez stymulację

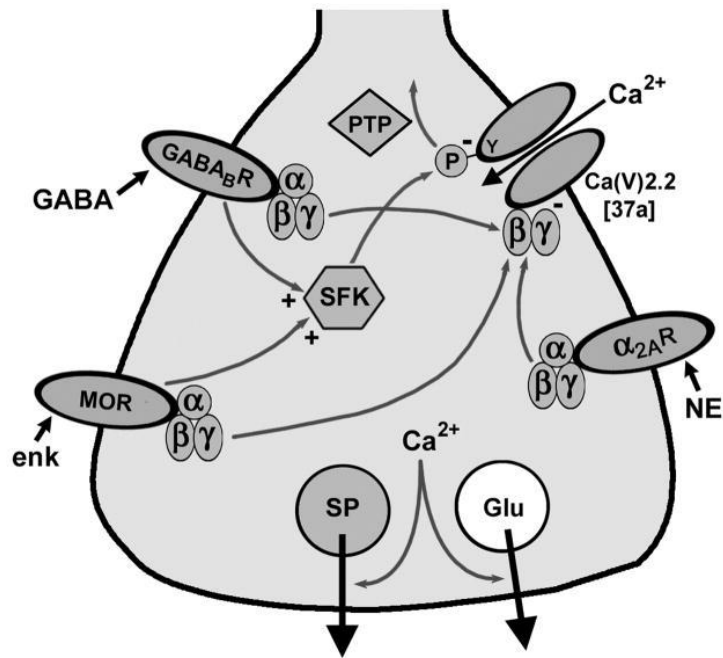
receptorów opioidowych. Starsze prace opisują iniekcje np. morfiny do struktury PAG co w efekcie powoduje powstanie efektu analgetycznego oraz pobudzenie neuronów RVM. Efekt ten znoszony jest przez niespecyficznego antagonistę receptorów opioidowych - nalokson (Cheng i wsp. 1986; Morgan i wsp. 1992). Ponadto zauważono wystąpienie zjawiska tolerancji krzyżowej pomiędzy efektem analgetycznym wywołanym przez egzogenne opioidy i analgezią związaną z elektryczną stymulacją PAG i uwolnieniem endogennych peptydów opioidowych (Mayer i Hayes 1975). W otrzymanym efekcie analgetycznym pośredniczą zarówno receptory μ jak i δ , bowiem mikroiniekcja selektywnych agonistów tych receptorów, odpowiednio DAMGO i deltorfiny prowokuje wystąpienie analgezji (Rossi i wsp. 1994). Konsekwentnie, badania oparte na hybrydyzacji *in situ* wykazały, że w PAG występuje duża gęstość receptorów opioidowych μ oraz δ , szczególnie w części grzbietowo-przyśrodkowej i przednio-bocznej w proporcji 50% do 27% (Wang i Wessendorf 2002). Ponieważ PAG posiada ograniczone połączenia z rdzeniem kręgowym, neurony przesyłają informację antynocyceptywną do rogów tylnych rdzenia kręgowego za pośrednictwem RVM (Basbaum i Fields 1984). RVM składa się z trzech rodzajów komórek różniących się poziomem aktywności związanej z reakcjami nocyceptywnymi. Komórki typu "on" posiadają na swojej powierzchni receptory opioidowe i odpowiedzialne są za nasilenie przewodzenia nocyceptywnego, natomiast komórki "off" za jego hamowanie. Po podaniu opioidów aktywowane są komórki typu "off" a aktywność komórek typu "on" jest zahamowana. Ten schemat aktywacji i spoczynku pozostaje taki sam, niezależnie od drogi podania opioidu. Mechanizm aktywacji komórek "off" nie jest całkowicie opioidozależny ale związany również z ich aktywacją poprzez hamowanie tonicznego uwalniania GABA (Roychowdhury i Fields 1996). Trzeci rodzaj neuronów (komórki neutralne) nie podlegają kontroli opioidów, zawierają natomiast serotoninę, za pośrednictwem której wpływają na aktywność komórek "on" i "off" (Fields i wsp. 1983; Heinricher i wsp. 1992).

Na podstawie wczesnych badań radioizotopowych określono, iż w rdzeniu kręgowym wszystkie typy receptorów opioidowych zlokalizowane są w błonie pierwotnych neuronów czuciowych (największe zagęszczenie na zakończeniach włókien C) w rogach tylnych rdzenia kręgowego (Petrillo i wsp. 1992). Opioidy hamują

przewodzenie sygnałów nocyceptywnych na poziomie rogów tylnych rdzenia kręgowego zarówno w błonie pre- jak i postsynaptycznej. Odbywa się to poprzez hamowanie uwalniania bądź hamowanie odpowiedzi na szerokie spektrum neuroprzekaźników. Hamowanie presynaptyczne polega na zablokowaniu przepływu jonów Ca^{2+} przez kanały VGCC w błonie presynaptycznej oraz otwarciu kanału K^+ co doprowadza do zahamowania uwalniania neuroprzekaźników takich jak: SP, CGRP, CCK oraz EAA z zakończeń pierwotnych włókien dośrodkowych. Hamowanie postsynaptyczne wiąże się z aktywacją kanałów K^+ i depolaryzacją błony oraz zahamowaniem odpowiedzi na neuroprzekaźniki neuronów rdzeniowo-wzgórzowych i wstawkowych (Jiang i North 1992; Law i wsp. 2000). Najlepiej poznanym mechanizmem działania przeciwbólowego opioidów na poziomie rogów tylnych rdzenia kręgowego jest modulacja uwalniania neuropeptydów a w szczególności SP. Jak wspomniano już wcześniej, SP uwalniana jest z zakończeń niezmielinizowanych włókien dośrodkowych biorąc udział w transmisji bólu na pierwszej synapsie w rogach tylnych rdzenia kręgowego, po zadziałaniu uszkodzającego bodźca termicznego, bądź mechanicznego. Ważną rolę SP w procesie nocycepcji potwierdzają obserwacje poważnych zaburzeń w odczuwaniu bólu nawet przy silnej stymulacji u myszy z delecją genu preprotachykininy (PPT) (Cao i wsp. 1998). Ponadto niektóre badania na komórkach HEK293 wskazują, że receptory μ oraz NK-1 dla SP tworzą heterodimery, co wpływa na zmiany w internalizacji oraz fosforylacji kompleksu (Pfeiffer i wsp. 2003).

Liczne badania począwszy od lat 80-tych opisywały przeciwstawne działanie SP i opioidów w procesie nocycepcji i antynocycepcji. Chociaż udokumentowano także analgetyczne właściwości bardzo niskich dawek SP związane z aktywacją receptora $GABA_A$ lub glicynowego i w efekcie z zahamowaniem aktywności neuronu projekcyjnego (Stewart i wsp. 1976; Wu i wsp. 2005). Niektóre prace jednak wykazują, że mechanizm analgetycznego działania SP jest związany tylko z aktywacją lokalnego wydzielania endogennych opioidów i ich działania na receptory postsynaptyczne bez udziału aktywacji receptorów tachykininowych (Kream i wsp. 1993). W doświadczeniach farmakologicznych w szczurzym modelu kapsaicynowym zauważono hamowanie uwalniania SP z zakończeń pierwotnych włókien dośrodkowych typu C po podaniu agonistów opioidowych. Zaobserwowano również, że hamowanie to

zależne jest od receptorów opioidowych μ i δ a nie κ (Aimone i Yaksh 1989). Intratekalne podanie SP u myszy spowodowało zależne od dawki, odwracalne po podaniu morfiny, wzmożenie zachowań bólowych takie jak drapanie i gryzienie (Hylden i Wilcox 1981). Badania mikroskopowe potwierdzały współwystępowanie aksonów zawierających receptory dla opioidów i SP w obrębie płytszych warstw rogów tylnych rdzenia kręgowego (I i II warstwa), gdzie informacja nocyceptywna modulowana jest przez uwalniane przez neurony wstawkowe peptydy opioidowe takie jak [Met]enkefaliny i dynorfiny (Ding i wsp. 1995; Aicher i wsp. 2000). Dalsze badania potwierdziły zaangażowanie oprócz receptorów μ i δ (Kondo i wsp. 2005) także innych receptorów z rodziny GPCR jak $GABA_B$ czy receptorów α_2 - adrenergicznych w procesie hamowania uwalniania SP (Ono i wsp. 1991; Malcangio i wsp. 1993). Mechanizm ten z udziałem receptorów μ i $GABA_B$ polega na zablokowaniu zależnych od napięcia kanałów dla jonów Ca^{2+} typu P/Q i N przy udziale kinaz Src albo poprzez wiązanie dimerycznego kompleksu ($\beta\gamma$) białka G (Dai i wsp. 2009; Zhang i wsp. 2010). Po związaniu liganda receptora μ lub/i $GABA_B$ dochodzi do obniżenia poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} i zahamowania wydzielania SP a także glutaminianu (Weiss i Burgoyne 2001; Raingo i wsp. 2007) (Ryc. 3).



Ryc. 3. Schemat hamowania uwalniania SP (SP) i glutaminianu (Glu) z błony presynaptycznej dośrodkowego neuronu czuciowego (za Zhang i wsp. 2010). enk - enkefalina, MOR - receptor opioidowy μ , NE - noradrenalina, PTP - białkowa fosfataza tyrozynowa, SFK - kinaza białkowa z rodziny Src.

Oprócz niewątpliwego wpływu opioidów na hamowanie wydzielania SP, analgezyja opioidowa wiąże się także z inhibicją uwalniania innych neuropeptydów probólowych takich jak CGRP czy CCK. CGRP jest zbudowanym z 37 aminokwasów peptydem, będącym produktem alternatywnego składania genu kalcytoniny (Rosenfeld i wsp. 1983). Obecność tego peptydu stwierdzono w strukturach OUN, głównie w podwzgórz, wzgórz i moście a także w tkankach obwodowych np. w trzustce (Rossum i wsp. 1997). Jednak głównym miejscem ich występowania są pierwotne zakończenia dośrodkowe włókien C, A δ i A β w warstwie I, II i V oraz przestrzeń okołokanałowa rogów tylnych rdzenia kręgowego. Neurony współczulne rogów brzusznych rdzenia kręgowego również zawierają CGRP (Ye i wsp. 1999). Ekspresja CGRP w większym stopniu niż innych peptydów probólowych obecna jest też w komórkach zwojowych. CGRP współistnieje z SP i receptorami opioidowymi typu μ w neuronach zwojowych oraz współwystępuje z EAA w pierwotnych zakończeniach dośrodkowych (Li i wsp. 1998). GCRP zaangażowany jest w powstawanie

nadpobudliwości neuronów a jego ekspresja zwiększa się w przebiegu procesów zapalnych (Garry i Hargreaves 1992). CGRP bierze udział w hamowaniu degradacji SP oraz wzmacnia jej dyfuzję w rogach tylnych rdzenia kręgowego wzmacniając stymulację nocyceptywną (Le Greves i wsp. 1985). Przeciwbólowe działanie opioidów polegające na hamowaniu presynaptycznego wydzielania CGRP ma znaczenie w modelach przewlekłego bólu zapalnego, gdzie endogenne układy opioidowe pełni ważną rolę (Pohl i wsp. 1997). W szczurzym modelu zapalenia stawów, w stanie zwiększonego uwalniania CGRP zaobserwowano bowiem zwiększoną ekspresję enkefalin i dynorfiny B w OUN oraz zmianę profilu ekspresji receptorów opioidowych w rogach tylnych rdzenia kręgowego (Besse i wsp. 1992; Spetea i wsp. 2002; Li i wsp. 2005). Udział endogennego systemu opioidowego potwierdzają wyniki doświadczeń, w których efekt analgetyczny obserwowany po podaniu antagonisty CGRP₈₋₃₇ u szczurów poddanych poparzeniu, był częściowo odwracalny przez nalokson oraz specyficznych antagonistów receptorów opioidowych μ i δ (Lofgren i wsp. 1998). Także doświadczenia z użyciem egzogennych agonistów receptorów opioidowych μ - morfiny i DAMGO potwierdziły zahamowanie uwalniania CGRP na poziomie rdzenia kręgowego w szczurzym modelu zapalenia wielostawowego (Ballet i wsp. 1998). W modelach ostrych nie stwierdzano natomiast obniżenia uwalniania CGRP po podaniu selektywnych jak i nieselektywnych agonistów receptorów opioidowych (Collin i wsp. 1993).

Cholecystokinina podobnie jak CGRP należy do grona probólowych neuropeptydów nieopiodowych i również jest układem modulowanym przez opioidy w szlaku analgetycznym. CCK po raz pierwszy została opisana jako hormon regulatorowy zlokalizowany w komórkach endokrynych układu pokarmowego (Larsson i Rehfeld 1978). Dalsze badania dowiodły jej rozpowszechnienie także w układzie nerwowym, gdzie występuje jako oktapeptydowy fragment 33 aminokwasowego peptydu. W OUN peptyd ten zlokalizowany jest w obszarach zaangażowanych w przewodzenie informacji nocyceptywnej takich jak PAG, RVM, podwzgórze, kora czołowa oraz rdzeń kręgowy. W rogach tylnych rdzenia kręgowego głównym źródłem CCK są neurony wstawkowe zlokalizowane w warstwie I-II oraz IV-VI (Conrath-Varrier i wsp. 1984; Schiffmann i Vanderhaeghen 1991). Receptory dla CCK występują w dwóch podtypach: CCK1 zlokalizowanych głównie w tkankach obwodowych i CCK2 obecnych głównie

w OUN (Innis i Snyder 1980). CCK należy do peptydów obniżających potencjał analgetyczny opioidów poprzez zablokowanie kanałów K^+ oraz zwiększenie zależnego od PKC stężenia wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} po depolaryzacji błony komórkowej (Yang i wsp. 2007). Podana intratekalnie bądź obwodowo CCK antagonizuje efekt analgetyczny morfiny a podanie specyficznego antagonisty receptora CCK2 - L-365,260 wzmacnia analgetyczne działanie tego opioidu w modelu zapalnego bólu trzewnego (O'Neill i wsp. 1989; Friedrich i Gebhart 2000). Zwiększone uwalnianie anty-opioidowego peptydu CCK w modelach eksperymentalnego uszkodzenia nerwu kulszowego częściowo wyjaśnia natomiast zmniejszoną efektywność morfiny w tych modelach (Xu i wsp. 1993). Ponadto, delecja genu receptora CCK2 w mysim modelu bólu neuropatycznego Bennetta (Bennett i Xie 1988) prowadzi do złagodzenia zjawisk allodynii i hiperalgezji wskutek zwiększenia aktywności endogenego systemu opioidowego (Pommier i wsp. 2002; Kurrikoff i wsp. 2004).

Kolejnym, równie ważnym mechanizmem biorącym udział w analgetycznym działaniu opioidów na poziomie rogów tylnych rdzenia kręgowego, oprócz interakcji z układami neuropeptydów probólowych, jest wpływ na receptory glutaminergiczne typu NMDA. Metody autoradiograficzne wykazały obecność tych receptorów głównie w substancji galaretowatej (warstwa II) rogów tylnych rdzenia kręgowego, przy praktycznie jednoczesnym ich braku w innych miejscach istoty szarej rdzenia kręgowego (Kalb i Fox 1997). Przyjmuje się, że receptory NMDA zlokalizowane są przede wszystkim w błonie postsynaptycznej. Badania wskazują jednak na ich obecność w błonie presynaptycznej zarówno w strukturach mózgu jak i rdzenia kręgowego (Parada i wsp. 2002; Corlew i wsp. 2008). W OUN receptory NMDA zlokalizowane presynaptycznie biorą udział w modulacji uwalniania GABA w korze nowej oraz na synapsach neuronów wstawkowych mózdzku i komórek Purkiniego. W rdzeniu kręgowym receptory te biorą udział w regulacji uwalniania SP oraz glutaminianu (Bardoni i wsp. 2004). Wzór rozmieszczenia receptorów NMDA pokrywa się z rozmieszczeniem receptorów opioidowych w strukturach rogów tylnych rdzenia kręgowego. Współistnienie tych dwóch typów receptorów, szczególnie nasilone w warstwie I oraz substancji galaretowatej, przemawia za ich bliską funkcjonalną

zależnością (Keniston i wsp. 1998). Współdziałanie układu opioidowego z układem NMDA w procesie rozwoju analgezji zostało opisane zarówno w doświadczeniach ostrych jak i przewlekłych. Jednakże wyniki badań ostrych są niejednoznaczne i wymagają dalszego badania. W niektórych modelach zwierzęcych antagoniści NMDA nie tylko wzmagają siłę analgezji opioidowej ale także przedłużają jej działanie (Baspalov i wsp. 1997; Advokat i Rhein 1995). Podobny efekt zaobserwowano także u ludzi, gdzie dekstrometorfan nie tylko powodował złagodzenie bólu pooperacyjnego ale także zmniejszenie zapotrzebowania na opioidy (Wu i wsp. 1999). Niektóre badania wskazują wprawdzie na zwiększenie efektu analgetycznego opioidów przez szereg różnych antagonistów NMDA, jednak tylko w dużych dawkach (Redwine i Trujillo 2003).

W badaniach elektrofizjologicznych agoniści receptorów opioidowych podani przed zadziałaniem bodźca bólowego hamują powstawanie zjawiska "wind-up" w neuronach rogów tylnych rdzenia kręgowego w teście formalinowym, co wskazuje na interakcję między receptorami opioidowymi i NMDA (Chapman i wsp. 1994; Vaccarino i wsp. 1997). Zjawisko samonakręcania powstaje bowiem wskutek powtarzającej się stymulacji włókien C i skorelowane jest z pojawieniem się silnego wzrostu aktywności tych neuronów utrzymującej się znacznie dłużej niż działanie bodźca. Procesy te związane są z aktywacją receptorów NMDA, gdyż podanie antagonistów NMDA efektywnie uśmierza ból zapalny występujący w drugiej fazie testu formalinowego (Eisenberg i wsp. 1993). W modelu bólu neuropatycznego Chunga (Kim i Chung 1992) intratekalne podanie MK-801 przed iniekcją morfiny doprowadziło do ustąpienia objawów allodynii, podczas gdy oba związki podane oddzielnie nie wykazały takiego efektu (Nichols i wsp. 1997). Wiele badań farmakologicznych wskazuje na udział receptorów NMDA w procesach rozwoju tolerancji opioidowej. Wiele grup badawczych wykazało, że podanie niekompetycyjnych (MK-801, dekstrometorfan) oraz kompetycyjnych (LY235959) antagonistów NMDA skutkowało zahamowaniem rozwoju tolerancji morfinowej nie mając jednak wpływu na tolerancję uzyskaną po przewlekłym podaniu selektywnych agonistów receptorów opioidowych (Elliot i wsp. 1994; Bilsky i wsp. 1996; Allen i Dykstra 1999). Pojawienie się zjawiska tolerancji jest silnie skorelowane ze wzrostem ekspresji błonowej izoforymy γ enzymu PKC, odpowiedzialnej

za fosforylację i desensytyzację receptorów opioidowych w warstwie I i II rogów tylnych rdzenia kręgowego (Granados-Soto i wsp. 2000; Feng i Wang 2011). W badaniach immunocytochemicznych po intratekalnym podaniu MK-801 zaobserwowano zmniejszenie się immunoreaktywności PKCy, co potwierdza zaangażowanie receptorów NMDA w regulację ekspresji lub translokacji komórkowej PKC (Mao i wsp. 1995). Kolejnym dowodem na istotną rolę receptorów NMDA na procesy rozwoju tolerancji jest fakt, iż myszy pozbawione genu kodującego izoenzym PKCy wykazują znacznie mniejszą podatność na jej rozwój niż myszy typu dzikiego (Zeitzi i wsp. 2001). Ponadto aktywacja receptora NMDA prowadzi do aktywacji kinaz białkowych zależnych od cGMP, które fosforylują receptor opioidowy związany z ligandem i promują wiązanie β -arestyny, uniemożliwiając interakcję receptora z białkiem G (Krupnick i Benovic 1998). Procesy te są więc w przeciwstawie do mechanizmów działania analgetycznego opioidu a zatem ich zablokowanie poprzez podanie antagonistów NMDA wpływa na opóźnienie wystąpienia zjawiska tolerancji.

1.6 Mechanizm analgezji obwodowej

Analgezja opioidowa przez długi czas uważana była za zjawisko, w którym pośredniczą receptory opioidowe zlokalizowane w OUN. Pierwsze doniesienie dotyczące przeciwbólowego działania opioidów podanych miejscowo zaprezentował Wood w 1855r. Od tamtego czasu, a właściwie w ostatniej dekadzie, zebrano wiele dowodów na poparcie tezy, że receptory opioidowe występujące w tkankach obwodowych stanowią przydatne narzędzie terapeutyczne (Stein 1995). Analgezja obwodowa niesie ze sobą wiele korzyści m.in. brak ośrodkowych działań niepożądanych, charakterystycznych dla opioidów podawanych systemowo jak np. nudności, senność czy rozwój tolerancji i tolerancji krzyżowej (Tokuyama i wsp. 1998; Ueda i Inoue 1999). O analgezji obwodowej wspomina się najczęściej w kontekście bólu zapalnego bądź neuropatycznego. W warunkach toczącego się stanu zapalnego, bądź w efekcie uszkodzenia nerwu obwodowego, dochodzi do zwiększenia liczby zakończeń włókien czuciowych prezentujących receptory opioidowe. Dochodzi też do nasilonej ich syntezy w komórkach zwojowych. Efektywniejsze wiązanie związków opioidowych do obwodowych receptorów opioidowych w warunkach nasilenia

procesów zapalnych, wiąże się ze zwiększeniem liczby receptorów, zmianami pH oraz przepuszczalności onerwia. W warunkach patologicznych dochodzi bowiem do zwiększenia jego przepuszczalności, co sprzyja zarówno szybszej dyfuzji ligandów jak i przenikaniu związków o większej masie cząsteczkowej (Antonijevic i wsp. 1995). Spadek pH sprzyja natomiast wydajniejszemu sprzężaniu elementów białka G z efektorami i efektywniejszemu przekazaniu informacji za pomocą drugorzędowych systemów przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego (Zollner i wsp. 2003, Vetter i wsp. 2006). W zwierzęcych modelach bólu zapalnego i neuropatycznego obserwuje się ekspresję receptorów typu μ , κ oraz δ , związaną z wywołanym przez cytokiny prozapalne łączeniem się czynników transkrypcyjnych do promotorów genów tych receptorów. Niektóre badania wskazują także na preferencyjną, dwufazową ekspresję receptora typu μ w warunkach miejscowego zapalenia wywołanego adjuwantem Freund'a. Następnie nowosyntetyzowane receptory transportowane są zarówno w kierunku rogów tylnych rdzenia kręgowego jak i wzdłuż aksonu w kierunku zakończeń obwodowych nerwów czuciowych, gdzie wchodzi w interakcję z endogennymi peptydami opioidowymi wydzielanymi z leukocytów jak i opioidami egzogennymi (Kraus i wsp. 2001; Puhler i wsp. 2004, 2006; Obara i wsp. 2009). Naciekające we wczesnej fazie zapalenia granulocyty a następnie monocyty i limfocyty czy pod wpływem czynnika uwalniającego kortykotropinę, IL-1 β czy noradrenaliny uwalniają z ziarnistości endogenne peptydy opioidowe, które wiążą się z obwodowymi receptorami opioidowymi (Mousa i wsp. 2003). Ważną rolę, jaką spełnia układ immunologiczny w obwodowej kontroli bólu, potwierdzają doświadczenia na szczurach, gdzie wywołanie immunosupresji cyklosporyną A prowadzi do całkowitego zaniku endogennej analgezji opioidowej, przywracanej po podaniu aktywowanych limfocytów (Hermanussen i wsp. 2004). Zjawisko pobudzenia obwodowych receptorów opioidowych ma znaczenie także w warunkach fizjologicznych w modelach bólu ostrego. Metadon po podaniu dokomorowym bądź intratekalnym w mysim i szczurzym modelu bólu ostrego wykazywał słabsze działanie analgetyczne niż morfina podana tą samą drogą. Przyczyną tego zjawiska było zaangażowanie obwodowych receptorów opioidowych w analgezę wywołaną przez metadon, gdyż obwodowe podanie metylojodku naloksonu doprowadziło do zaniku odpowiedzi analgetycznej wywołanej

przez ośrodkowo podany metadon (He i wsp. 2009). Udział analgezji obwodowej w efekcie analgetycznym wywoływanym przez metadon był ściśle związany z jego lipofilną strukturą. Po podaniu intratekalnym metadon szybko przenika bowiem do przestrzeni zewnątrzoponowej i szybciej niż morfina przechodzi do krwioobiegu (Rathmell i wsp. 2005).

Jedną z pierwszych prób klinicznych wykorzystania mechanizmu analgezji obwodowej było dostawowe podanie niskiej dawki morfiny pacjentom po artroskopii stawu kolanowego. Zaobserwowano wtedy, że miejscowe podanie analgetyku skutkowało silniejszą analgezą niż podanie dożylne (Stein i wsp. 1991). Od tego czasu wiele badań w zwierzęcych modelach przewlekłych stanów bólowych poświęconych było skuteczności analgezji obwodowej wywołanej przez klasyczne opioidy, peptydy opioidowe oraz ich analogi. W mysim modelu zapalnego bólu trzewnego podskórna iniekcja agonistów receptora μ oraz κ (odpowiednio analog endomorfiny-1 oraz tetrapeptyd CR665) ograniczała liczbę skrętów ciała wywołanych kwasem octowym. (Vanderah i wsp. 2008; Bedini i wsp. 2010). Podobne wyniki otrzymano w modelu bólu neuropatycznego Bennetta przy zastosowaniu peptydowych i niepeptydowych agonistów receptora μ : endomorfiny, DAMGO oraz 14-O-metylo-oksymorfonu redukujących objawy allodynii (Obara i wsp. 2004; 2007). Również w modelach nowotworowego bólu kostnego zaobserwowano, iż lokalne podanie specyficznych agonistów trzech typów receptorów opioidowych oraz loperamidu charakteryzującego się słabą penetracją BBB powoduje zniesienie hiperalgezji (Menendez i wsp. 2003; 2005; Baamonde i wsp. 2005). We wszystkich wyżej wymienionych modelach zwierzęcych w wytworzenie efektu analgetycznego zaangażowane były obwodowe receptory opioidowe. Obserwowana anagezja odwracana była bowiem poprzez podanie nieprzenikającego BBB antagonistę receptorów opioidowych - metylojodek naloksonu. Przydatność kliniczną analgezji obwodowej udowodniono także w ludzkich, eksperymentalnych modelach skórno-bólu zapalnego oraz mięśniowego. Krótkotrwały wlew niskiej dawki metabolitu morfiny - 6- β -glukuronidu skutecznie hamował wystąpienie hiperalgezji w wyniku wiązania się z obwodowymi receptorami opioidowymi (Tegeder i wsp. 2003). Główne badania dotyczące analgezji obwodowej z zastosowaniem związków opioidowych dotyczyły *de facto* ich lokalnego podawania.

Jednakże w wielu przypadkach lokalne podanie analgetyku nie jest możliwe (np. w przypadku przerzutów) i niezbędne jest wybranie innej drogi podania np. dożylniej. Także z uwagi na fakt, iż analgezja obwodowa sama w sobie nie jest wystarczająca do satysfakcjonującego uśmierzania bólu nowotworowego poszukuje się związków zdolnych do aktywacji obwodowych receptorów opioidowych oraz przenikających BBB.

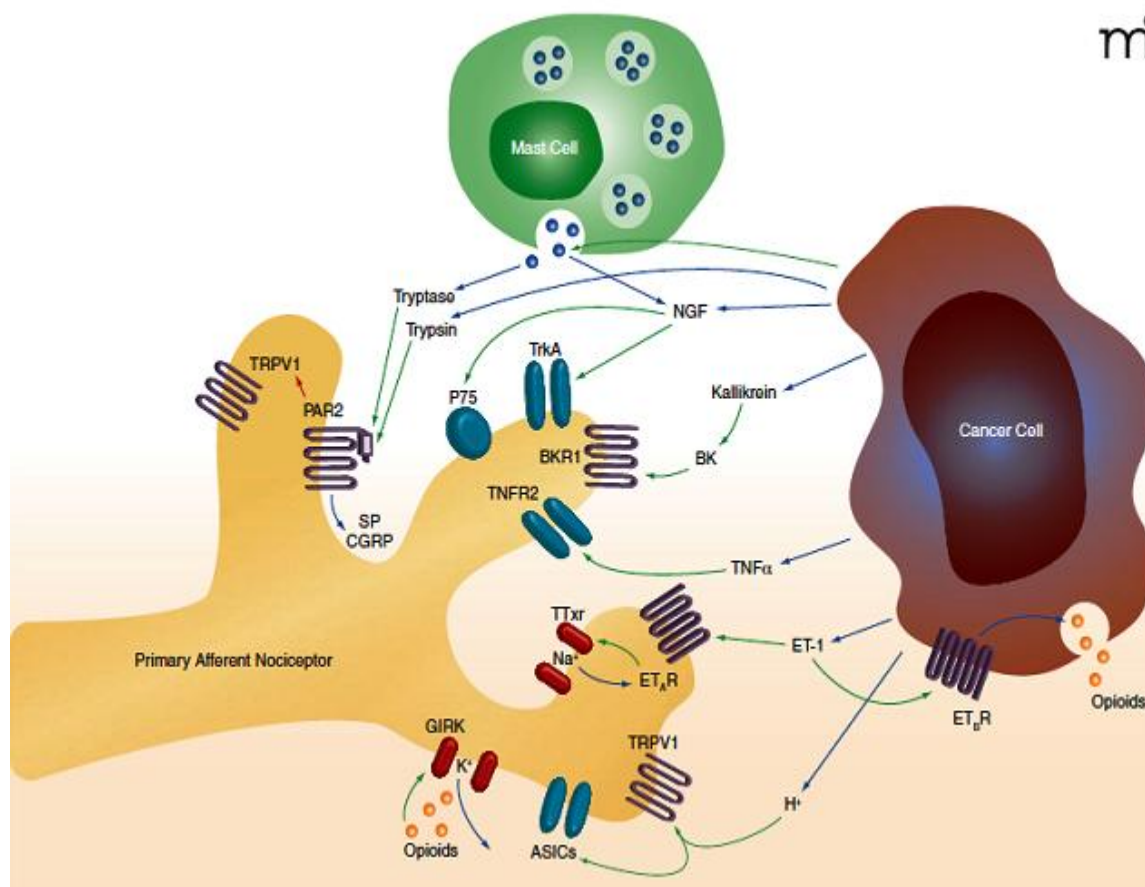
1.7 Ból nowotworowy

1.7.1 Klasyfikacja i etiologia bólu nowotworowego

Na całym świecie ból w chorobie nowotworowej jest poważnym problemem społecznym, który w zaawansowanym stadium choroby dotyka ponad 70% pacjentów i jest określany jako ból o dużym nasileniu (Bonica i wsp. 1982). Starzenie się społeczeństwa sprzyja dalszej eskalacji problemu. Szacunkowo liczba pacjentów cierpiących z powodu bólu nowotworowego wzrośnie o 50% do 15 milionów w 2020 roku (World Health Organization 2007). Za powstawanie bólu nowotworowego odpowiedzialne są różne mechanizmy co utrudnia jego klasyfikację. W praktyce klinicznej rzadko zdarza się aby ból nowotworowy występował tylko w postaci czystego bólu receptorowego bądź neuropatycznego (Bennett i wsp. 2006). Dodatkowo, w przeciwieństwie do większości innych syndromów bólowych, ból nowotworowy ma charakter zmienny zależnie od typu leczenia, typu histologicznego nowotworu oraz jego umiejscowienia a także od stanu emocjonalnego pacjenta. Nakłada to na lekarza obowiązek ciągłej oceny objawów bólowych u chorego. Neurofizjologia bólu nowotworowego nie różni się od innych rodzajów bólu pod wieloma względami. Transmisja bodźców nocycyptywnych odbywa się bowiem przy udziale tych samych włókien A δ oraz włókien C, poprzez te same receptory i mechanizmy transdukcji, co w przypadku nienowotworowego bólu ostrego czy chronicznego (Besson 1999).

Niemniej jednak można podjąć się próby klasyfikacji bólu nowotworowego z punktu widzenia etiologicznego oraz neurofizjologicznego. Klasyfikacja etiologiczna na pierwszym miejscu wymienia ból będący wynikiem obecności nowotworu lub jego przerzutów. Objawy bólowe w postaci przeczulicy na bodźce bólowe skorelowane są z progresywnym rozrastaniem się guza nowotworowego oraz jego uciskiem na

okoliczne tkanki i nerwy oraz przetrzutami do kości i narządów mięszowych. Komórki nowotworowe produkują oraz wydzielają do mikrośrodowiska mediatory modulujące nocycepcję. Do mediatorów tych należą min. protony, endotelina - 1, TNF α , NGF oraz enzymy proteolityczne takie jak kalikreina i trypsyna. Aktywność proteolityczna komórek nowotworowych jest kluczowa w procesie karcinogenezy i wystąpienia bólu nowotworowego. Trypsyna wydzielana z komórek nowotworowych oraz tryptaza uwalniana z komórek tucznych aktywują receptor aktywowany proteazami typu 2 (PAR₂) na neuronach czuciowych co powoduje uwolnienie SP i CGRP oraz aktywację receptorów waniloidowych TRPV1 i TRPV4 odpowiedzialnych za powstawanie hiperalgezji termicznej i mechanicznej (Hoogerwerf i wsp. 2001; Amadesi i wsp. 2006; Grant i wsp. 2007) (Ryc. 4). Kalikreina oprócz aktywacji PAR dodatkowo zwiększa uwalnianie bradykininy z neuronów czuciowych (Gao i wsp. 2010). W wielu typach nowotworów np. raka trzustki czy raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, neurony czuciowe narażone są na chronicznie podwyższony poziom NGF uwalniany przez komórki nowotworowe. Poprzez wiązanie się z receptorami TrkA oraz P75, NGF promuje zwiększone naciekanie nowotworu wzdłuż przestrzeni okołonerwowych, co pociąga za sobą eskalację objawów bólowych o podłożu zapalnym (Ma i wsp. 2008; Kolokythas i wsp. 2010; Ye i wsp. 2011).



Ryc. 4. Schemat komórkowych mechanizmów sensytyzacji dośrodkowych neuronów czuciowych w warunkach rozwoju nowotworu (za Schmidt i wsp. 2010). ASICs - kanały aktywowane protonami, BK - bradykinina, BKR1 - receptor dla bradykininy - 1, CGRP - peptyd związany z genem kalcytoniny, ET-1 - endotelina - 1, ET_AR - receptor typu A dla endoteliny-1, ET_BR - receptor typu B dla endoteliny 1, GIRK – związane z białkiem G wewnątrzprostownicze kanały potasowe, NGF - czynnik wzrostu nerwów, PAR2- receptor proteaz, SP - substancja P, TNFR2 - receptor dla czynnika martwicy nowotworu - 2, TNF α - czynnik martwicy nowotworu, TrkA - receptor dla kinazy tyrozynowej A, TRPV -1 - receptor waniloidowy - 1, TTxr - kanał sodowy niewrażliwy na tetrodoksynę.

Drugim typem bólu jest ból pojawiający się w toku leczenia przeciwnowotworowego. Zespoły bólowe pojawiają się u pacjentów z chorobą nowotworową po przebytych operacjach np. mastektomii (Hickey i wsp. 2011), nefrektomii (Owen i wsp. 2010), torakotomii (Guastella i wsp. 2011) oraz po zabiegach amputacyjnych, gdzie pojawia się problem bólu fantomowego (Burgoyne i wsp. 2011; Markopoulos i wsp. 2010). Innym źródłem bólu są dolegliwości będące skutkiem chemioterapii bądź radioterapii (Farguhar-Smith 2011; Panagiotis i wsp. 2008)

objawiające się hiperalgezą oraz allodynią. Badania kliniczne oraz doświadczenia na zwierzętach udowodniły, że powszechnie stosowane chemioterapeutyki jak paklitaksel (Mielke i wsp. 2006; Siau i wsp. 2006), winkrystyna (Gomber i wsp. 2010; Dougherty i wsp. 2011), bortezomib (Boyette-Davis i wsp. 2011), oksaliplatyna i cisplatyna (Cetin i wsp. 2011; Gauchan i wsp. 2009) wywołują objawy termicznej hiperalgezji oraz allodynii związanych z uszkodzeniem nerwów obwodowych. Kolejnym rodzajem bólu pojawiającego się w terminalnym stadium choroby jest ból związany z wyniszczeniem nowotworowym. Objawy bólowe związane są przykładowo z odleżynami, skurczami mięśni poprzecznie prążkowanych, zaparciami, stanami zapalnymi jamy ustnej i przełyku, niedokrwieniem kończyn. Większość dolegliwości bólowych jest więc związanych z trwałym unieruchomieniem. Do bólów nowotworowych zalicza się także bóle występujące u chorych, lecz niezwiązane bezpośrednio z obecnością nowotworu czy też przebyłym leczeniem. W praktyce oznacza to, że bóle nowotworowe mogą także dotyczyć osób wyleczonych. Należą one do grupy bólów koincydentalnych występujących u 3-10% pacjentów i są nimi np. bóle wieńcowe, bóle głowy, kręgosłupa lędźwiowego czy stawów.

W kontekście neurofizjologicznym ból nowotworowy dzielimy na receptorowy oraz niereceptorowy. Ból receptorowy powstaje wskutek mechanicznego lub chemicznego drażnienia receptorów nerwów czuciowych przez mediatory zapalenia wokół guza nowotworowego, przerzutów, napiętych, niedokrwionych torebek narządów mięszzowych lub jelit. Ważną cechą bólu receptorowego jest fakt, iż drogi przewodzenia pozostają nieuszkodzone. Wśród bólów nowotworowych receptorowych wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje: somatyczny oraz trzewny. Ból somatyczny związany jest z pobudzaniem receptorów skóry, opłucnej, okostnej, jest zwykle stały, dobrze umiejscowiony i zlokalizowany. Najbardziej rozpowszechnionym miejscem pojawienia się objawów bólu nowotworowego somatycznego jest tkanka kostna. Ból ten przyjmuje charakter ostry, przewlekły lub incydentalny i dotyka od 28-45% pacjentów u których zdiagnozowano przerzuty do kości (Grond i wsp. 1996; Portenoy i wsp. 1999; Coleman 2006). Przerzuty te występują u 85% pacjentów cierpiących na raka płuca (Lipton i wsp. 2000), piersi (Rosen i wsp. 2004) lub prostaty (Saad i wsp. 2005) i są skorelowane z wysoką śmiertelnością (Nielsen i wsp. 1991). Przyczyną

nowotworowego bólu kostnego są zaburzenia równowagi pomiędzy aktywnością osteoklastów, mających zdolność rozpuszczania i resorpcji tkanki kostnej, oraz osteoblastów biorących udział w jej wzroście i przebudowie. Należy także wspomnieć, że podstawowemu bólowi nowotworowemu towarzyszą często dodatkowe rodzaje bólów. Zalicza się do nich bóle przebijające, występujące u ok. 50% pacjentów leczonych opioidami, przejawiające się w postaci nagłego napadu bólu o krótkim czasie trwania (Portenoy i wsp. 1999). Do kategorii szczególnych rodzajów bólu nowotworowego zaliczamy także ból incydentalny czy ból końca dawki. Pierwszy typ bólu pojawia się podczas wykonywania podstawowych czynności np. poruszanie się. Natomiast ból końca dawki pojawia się regularnie u pacjentów otrzymujących zbyt niską dawkę leku przed podaniem kolejnej jego dawki (Payne 2007).

Ból trzewny związany jest z pobudzeniem receptorów narządów wewnętrznych klatki piersiowej i jamy brzusznej, ma charakter rozlany, opisywany jako rozpieranie, ucisk, przeszywanie. Związany jest z pobudzeniem wegetatywnego układu nerwowego, przez co oprócz objawów bólowych występują także nudności, wymioty, kołatanie serca, zwiększone pocenie się oraz niepokój (Al-Chaer i Traub 2002). Pacjenci często nie są w stanie określić precyzyjnie źródła bólu ze względu na mniejszą gęstość występowania receptorów czucia trzewnego w porównaniu do receptorów skórnych, co czyni go trudnym w leczeniu (Cerevero i Baird 1999).

Termin ból nowotworowy niereceptorowy odnosi się do bólu neuropatycznego wywołanego uszkodzeniem nerwów obwodowych, bądź struktur OUN i rdzenia kręgowego wskutek rozrostu guza, zabiegów operacyjnych, chemioterapii czy komplikacji po radioterapii. Neuropatyczne zespoły bólowe u pacjentów w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej wynikające z rozrostu guza obejmują ucisk na korzenie i sploty nerwowe, przerwanie ciągłości nerwu wskutek nacieku czy kompresji rdzenia kręgowego w guzach pierwotnych i przerzutowych mózgu. Bóle neuropatyczne obwodowe opisywane są jako bóle z odnerwienia (deafferentacyjne). Odnoszą się zarówno do nieprawidłowych wrażeń parzenia, pieczenia czy mrowienia na powierzchni skóry jak i do napadowo występujących, przeszywających bóli przypominających rażenie prądem. Neuropatyczne bóle ośrodkowe wynikają ze zmian anatomicznych lub czynnościowych w obrębie dróg

przewodzenia bólu takich jak: rogi tylne rdzenia kręgowego, pień czy kora mózgu. Towarzyszą one w większości łagodnym niż złośliwym zmianom nowotworowym ze względu na krótki czas przeżycia pacjentów (Kotlińska-Lemieszek i Luczak 1999).

1.7.2 Farmakoterapia bólu nowotworowego

Terapia bólu w przypadku pacjentów zmagających się z chorobą nowotworową stanowi prawdziwe wyzwanie dla współczesnej medycyny. Najpopularniejszą, konwencjonalną metodą walki z bólem nowotworowym jest farmakoterapia według zaleceń Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) ustanowionych w 1986 roku, proponujących trzystopniowy schemat stosowania leków przeciwbólowych w zależności od natężenia bólu. W Polsce ustalone standardy leczenia bólu nowotworowego opierają się na zaleceniach WHO oraz Europejskiego Stowarzyszenia Opieki Paliatywnej (EAPC) (Hilgier i Jarosz 2004). Strategia leczenia oparta jest na kilku założeniach m.in.: stosowania leków silniejszych w przypadku, gdy słabsze nie dają zadowalającego efektu analgetycznego oraz ich regularnego stosowania; podawania tzw.: "ratujących" dawek leków w sytuacji pojawienia się nagłego napadu bólu (np. bóle przebijające); kojarzeniu leków przeciwbólowych z lekami uzupełniającymi (adjuwantami) nasilającymi ich efekt lub redukującymi działania niepożądane; wybraniu najwygodniejszej dla pacjenta drogi podania.

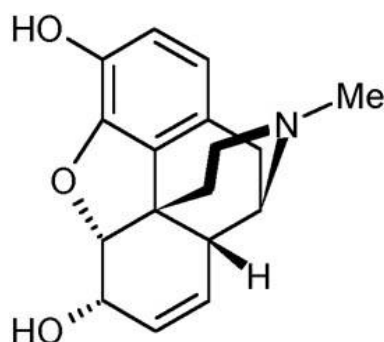
Odpowiednie postępowanie, zgodne z tzw. "drabiną analgetyczną" pozwala skutecznie wyeliminować ból w przypadku 80-90% chorych (Zech i wsp. 1995). Oceny natężenia bólu dokonuje się najczęściej z użyciem specjalnych skal numerycznych mających postać linijki, gdzie coraz to większym cyfrom przypisane jest wzrastające uczucie bólu. Pierwszy szczebel drabiny analgetycznej stanowią niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) takie jak: paracetamol, diklofenak czy ibuprofen stosowane w uśmierzaniu bólu nowotworowego receptorowego o słabym bądź umiarkowanym nasileniu (Mercadante i wsp. 1999). Mechanizm ich działania przeciwbólowego polega na zahamowaniu wzmożonej produkcji prostaglandyn poprzez blokowanie aktywności COX-2. Przyjmowanie NLPZ wiąże się niestety z wystąpieniem efektów niepożądanych ze strony układu pokarmowego takich jak krwawienia czy owrzodzenia. Wynikają one z jednoczesnego hamowania aktywności COX-1 i obniżenia syntezy prostaglandyn

zapewniających prawidłowe funkcjonowanie śluzówki żołądka, nerek i innych narządów (Vanie i Botting 1998).

Opioidy są uznawane za najważniejszą grupę analgetyków stosowanych w leczeniu bólu nowotworowego. Zajmują one dwa ostatnie szczeble drabiny analgetycznej i kojarzone są często z analgetykami z niższych szczebli np. NLPZ czy innymi inhibitorami COX, gdyż zwiększają one działanie przeciwbólowe opioidów (Malan i wsp. 2003; Zelcer i wsp. 2005). Opioidy takie jak kodeina, dihydrokodeina czy tramadol stosowane są w terapii bólu o niskim i średnim natężeniu. Obecnie standardowym słabym opioidem drugiego szczebla drabiny analgetycznej stosowanym w Polsce jest tramadol (Leppert 2009). Wykazuje on podwójny mechanizm działania polegający na wiązaniu się preferencyjnie z receptorami opioidowymi typu μ oraz zdolności do aktywacji serotonergicznego i noradrenergicznego zstępującego szlaku hamowania bólu (Hennies i wsp. 1988; Raffa i wsp. 1992). Dodatkowo stanowi dobry lek dla pacjentów skarżących się na uciążliwe dolegliwości jak senność czy zaparcia oraz pacjentów z nowotworowym bólem neuropatycznym (Sindrup i wsp. 1999; Leppert i wsp. 2005). Ważną zaletą tramadolu jest możliwość jego podawania doustnie w postaci kropli czy kapsułek (również o przedłużonym uwalnianiu) oraz drogą podskórną, dożylną i doodbytniczą. Ostatni, trzeci szczebel drabiny analgetycznej stanowi grupa silnych opioidów zalecanych przez WHO w leczeniu bólu umiarkowanego i silnego, niepoddającego się opioidom II stopnia. Głównymi przedstawicielami tej grupy jest morfina, fentanyl, metadon oraz buprenorfina.

Morfina jest najlepiej poznanym, prototypowym, silnym opioidem szeroko stosowanym w opiece paliatywnej do której porównuje się inne stosowane już leki opioidowe jak również nowe potencjalne analgetyki. Wykazuje preferencyjne wiązanie do receptorów typu μ wykazując jednak słabe powinowactwo do receptorów δ i κ . Morfina należy do pochodnych fenantrenu i jest jednym z 20 alkaloidów wchodzących w skład opium, substancji otrzymywanej z soku mlecznego pochodzącego z niedojrzałych owoców maku lekarskiego (*Papaver somniferum*)(Ryc. 5). Pierwsze wzmianki o „eliksirze z opium” sięgają czasów Bizancjum. Około roku 1552 szwajcarski lekarz i przyrodnik Paracelsus wspominał o naparze alkoholowym z opium nazywając go „laudanium” (od łac. *laudare* - chwalić). Morfina, została zidentyfikowana jako

aktywny składnik opium w 1804 r. przez Friedricha Sertürnera a 13 lat później wprowadzona na rynek jako analgetyk i lek w terapii uzależnienia od opium i alkoholu.



Ryc. 5. Struktura chemiczna morfiny.

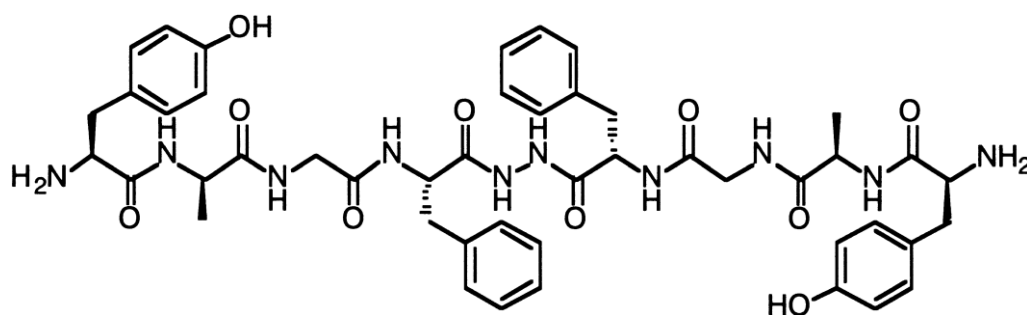
Morfina po podaniu systemowym podlega procesom metabolicznym w wątrobie (Bodenham i wsp. 1989), ścianie jelit (Mikus i wsp. 1999), nerkach (Yue i wsp. 1988) i mózgu (Wahlström i wsp. 1988). Znacząca ilość podanej morfiny podlega efektowi pierwszego przejścia w wątrobie, gdzie sprzęgana jest z kwasem glukuronowym przy udziale izoenzymu glukuronotransferazy UGT 2B7 (Coffman i wsp. 1997). Jej biodostępność waha się w granicach 30-40% a czas półtrwania 2-3h. Głównymi metabolitami morfiny jest morfino-3-glukuronian (M3G) oraz morfino-6-glukuronian (M6G). Około połowa dawki morfiny metabolizowana jest do nieaktywnego metabolitu M3G, którego potencjalne działanie analgetyczne poddawane jest w wątpliwość (Baker i wsp. 2003; Vaughan i Connor 2003). M3G przypisuje się natomiast właściwości neurotoksyczne (Smith 2000; Hemstapat i wsp. 2003) oraz odpowiedzialność za wystąpienie objawów niepożądanych, towarzyszących przeciwbólowej terapii morfinowej np. tolerancji (Smith i wsp. 1995) lub hiperalgezji i allodynii (Woolf 1981; Juni i wsp. 2006). Zaobserwowano także działanie antagonistyczne M3G w stosunku do receptorów opioidowych (Smith i wsp. 1990; Faura i wsp. 1996).

M6G jest aktywnym metabolitem morfiny stanowiącym ok. 10% produktów jej metabolizmu, o sile działania przekraczającym 2 do 4-krotnie siłę działania związku macierzystego (Osborne i wsp. 1990; Lotsch i Geisslinger 2001; van Dorp i wsp. 2006). M6G przypisuje się główną rolę w tworzeniu efektu analgetycznego po podaniu morfiny (Klepstad i wsp. 2000). Oprócz właściwości analgetycznych M6G

odpowiedzialny jest za wystąpienie działań niepożądanych takich jak: zaparcia (Leppert i Luczak 2001), opóźniona depresja oddechowa (Olofsen i wsp. 2010), nudności i wymioty (Binning i wsp. 2011) oraz senność (Hanna i wsp. 1991).

W 85% przypadków, terapia morfinowa daje zadowalające rezultaty, jednakże konieczne jest okresowe zwiększanie jej dawki oraz jednoczesne leczenie niepożądanych efektów ubocznych. Poważnym problemem w terapii morfinowej są zaparcia występujące częściej niż w przypadku leczenia np. buprenorfiną (Wolff i wsp. 2012). Niektórzy pacjenci wymagają jednak wysokich dawek morfiny niekiedy przekraczających 1g przy jednoczesnym braku zadowalającego efektu analgetycznego i silnie zaznaczonych objawach niepożądanych. W takim przypadku należy dokonać zmiany morfiny na inny silny opioid a także dokonywać rotacji opioidów co daje szansę na terapię bólów na nie opornych (Sartain i wsp. 2002).

Jednym z potencjalnie obiecujących analgetyków, który mógłby rozszerzyć wachlarz dostępnych analgetyków III stopnia drabiny analgetycznej jest bifalina oraz jej analogi. Bifalina [(Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH-)₂] została po raz pierwszy zsyntetyzowana przez Lipkowskiego i współpracowników (1987) (Ryc. 6).



Ryc. 6. Struktura chemiczna bifaliny.

Jest ona dimerycznym analogiem enkefaliny, gdzie oba tetrapeptydowe farmakofory połączone są ze sobą mostkiem hydrazydowym. Tetrapeptydowe „ramiona” cząsteczki są elastyczne i mogą dopasowywać się do komplementarnych struktur wewnątrz miejsca wiązania liganda w receptorze opioidowym. Bifalina wykazuje wysokie powinowactwo w stosunku do receptorów opioidowych typu μ i δ oraz umiarkowane powinowactwo do receptorów typu κ (Lipkowski i wsp. 1987; Slaninova i wsp. 1998). Bifalina zawdzięcza swoje powinowactwo do wszystkich typów

receptorów opioidowych temu, iż dwa farmakofory mają dużą giętkość konformacyjną, która pozwala cząsteczce na przyjęcie odpowiedniej konformacji do struktury receptora w zależności od warunków. Mostek hydrydowy jest natomiast fragmentem usztywniającym strukturę cząsteczki przeciwdziałając wewnętrznej agregacji (Stępiński i wsp. 1991). Wysokie powinowactwo bifaliny głównie do receptora μ oraz jej umiejętność przenikania przez barierę krew-mózg (BBB) (Abbruscato i wsp. 1996) bezpośrednio przekłada się na aktywność biologiczną tego dimerycznego peptydu *in vivo*. Bifalina dzięki obecności reszty D-Ala w pozycji 2 i 2' pozostaje odporna na działanie aminopeptydaz a mostek hydrydowy przeciwdziała rozkładowi dipeptydu przez karboksypeptydazy. Właściwości analgetyczne bifaliny zależą jednakże w dużej mierze od drogi podania. Największą aktywność wykazuje po podaniu dordzeniowym lub dokomorowym. Podskórne podanie nawet bardzo wysokich dawek bifaliny wywołuje bardzo słabą analgezję u zwierząt doświadczalnych, co wyklucza tę drogę podania jako klinicznie adekwatną (Silbert i wsp. 1991). Bifalina w porównaniu do morfiny w znacznie mniejszym stopniu prowokuje wystąpienie objawów odstawienia po przewlekłym podaniu (Yamazaki i wsp. 2001), posiada mniejsze zdolności hamowania pasażu żołądkowo-jelitowego *in vivo* (Horan i wsp. 1993), stymuluje proliferację limfocytów T, zwiększa cytotoksyczność komórek NK oraz syntezę IL-2 a także hamuje wytwarzanie TNF α *in vitro* (Mehrotra i wsp. 2002). *In vivo* bifalina stymuluje natomiast migrację limfocytów z naczyń krwionośnych obniżając jednak ich migrację do węzłów chłonnych oraz uwalnianie do limfy (Maksymowicz i wsp. 2000). Oprócz właściwości przeciwbólowych bifalina posiada także właściwości przeciwnowotworowe, ograniczając proliferację ludzkich komórek glioblastoma T98G *in vitro* (Lazarczyk i wsp. 2010), oraz właściwości przeciwwirusowe (Tang i wsp. 1998).

Ból nowotworowy najczęściej nie posiada czysto receptorowego charakteru i w zależności od wielu czynników charakteryzuje go występowanie dodatkowych komponent np. zapalnej wynikającej z wydzielania przez komórki nowotworowe mediatorów promujących proces zapalny, czy też komponenty neuropatycznej. Uszkodzenie struktur OUN lub nerwów obwodowych następuje wskutek naciekania lub ucisku przez komórki nowotworowe a także może być wynikiem przebytej chemioterapii. Uszkodzenie nerwów obwodowych wiąże się z wystąpieniem

niekontrolowanych, spontanicznych wyładowań elektrycznych wzdłuż włókien C oraz włókien A β o niskim progu pobudzenia. Statystyki pokazują, że ok 40-50% przypadków bólu nowotworowego określanych jest jako wyłącznie lub częściowo neuropatyczne (Gonzales i wsp. 2003). Neuropatyczny ból nowotworowy jest generalnie uważany za typ bólu opornego na przeciwbólowe działanie opioidów i wymaga równoległego stosowania leków adjuwantowych (koanalgetyków). Do tej grupy zaliczamy np. leki przeciwdrgawkowe (np. gabapentyna), lokalne anestetyki (np. lidokaina) czy blokery receptorów NMDA (np. ketamina) (Lussier i wsp. 2004). Jednakże, dane literaturowe wskazują, iż peptydy opioidowe podane w niskich, systemowo nieaktywnych dawkach, wywierają działanie przeciwhiperalgetyczne poprzez selektywną aktywację obwodowych receptorów opioidowych w modelach bólu nowotworowego. W mysim modelu nowotworowego bólu kostnego będącego konsekwencją implantacji komórek kostniakomięsaka linii NCTC2472 wewnątrz nasady kości piszczelowej, zaobserwowano najsilniejszą obwodową analgezję po podaniu DAMGO. Obserwacja ta sugeruje dominującą rolę receptorów typu μ w procesie powstawania zjawiska analgezji obwodowej. Receptory typu δ po podaniu DPDPE również uczestniczą w wytworzeniu obwodowego efektu przeciwbólowego, jednakże w mniejszym stopniu. Receptory obwodowe typu κ zdają się nie uczestniczyć w tym procesie. Zaangażowanie obwodowych receptorów opioidowych potwierdza również fakt braku efektu analgetycznego u zwierząt kontrolnych oraz w kończynie kontrolnej zwierząt inokulowanych a także odwrócenie efektu analgetycznego przez NLXM (Baamonde i wsp. 2005). Dominujące zaangażowanie receptorów typu μ w bliźniaczym modelu bólu kostnego potwierdzają również doświadczenia z użyciem looperamidu - związku opioidowego o słabych właściwościach przenikania BBB oraz morfiny. Podobnie, doświadczenia wykazały, że zarówno looperamid jak i morfina podnoszą próg bólowy, znosząc zjawisko hiperalgzji termicznej i mechanicznej jedynie w kończynie implantowanej komórkami NCTC2472. Efekt ten obserwowany jest nie tylko po lokalnym podaniu, lecz także w przypadku looperamidu po podaniu podskórnym w miejscu znacznie oddalonym od miejsca manifestacji objawów bólowych (Menendez i wsp. 2003; 2005). Obwodowy mechanizm analgetyczny wywołany podaniem looperamidu i morfiny jest prawdopodobnie związany z aktywacją szlaku

NO/cGMP/K⁺_{ATP} poprzez stymulację neuronalnej NOS (Rodrigues i Duarte 2000; Curto-Reyes i wsp. 2008). W świetle wyników powyższych badań, potwierdzających udział analgezji obwodowej w uśmierzaniu bólu nowotworowego, zasadne jest dalsze zgłębianie tematu i poszukiwanie związków, które po systemowym podaniu będą wywoływać swój efekt analgetyczny z udziałem zarówno obwodowych jak i zlokalizowanych w OUN receptorów opioidowych.

2. CELE PRACY:

Przeprowadzone badania miały na celu:

1. Wybór oraz adaptację opisanego w literaturze modelu bólu nowotworowego u myszy, jego ocenę morfologiczną oraz ocenę behawioralną lokalnych i ośrodkowych objawów bólowych.
2. Ocenę powinowactwa bifaliny oraz jej dwóch analogów: peptydów 5320 i 5311 do receptorów opioidowych oraz określenie ich efektywności w aktywacji wtórnych szlaków wewnątrzkomórkowego przekazywania przy użyciu technik radioizotopowych.
3. Określenie właściwości przeciwnowotworowych bifaliny oraz peptydów 5320 i 5311 *in vitro*.
4. Farmakologiczną ocenę działania przeciwbólowego bifaliny oraz peptydów 5320 i 5311 *in vivo* w mysim modelu bólu nowotworowego po podaniu ostrym.
5. Ocenę udziału obwodowego efektu antynocyceptywnego bifaliny oraz peptydów 5320 i 5311 w sumarycznym efekcie przeciwbólowym w mysim modelu bólu nowotworowego.
6. Ocenę wystąpienia zjawiska tolerancji po podaniu bifaliny oraz peptydu 5320 w mysim modelu bólu nowotworowego.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Doświadczenia radioizotopowe

Powinowactwo analizowanych związków opioidowych wobec receptorów opioidowych μ i δ badano metodą kompetycyjnego radioizotopowego wiązania receptorowego. Polega ona na konkurencyjnym wiązaniu selektywnego radioaktywnego agonisty do receptora opioidowego μ lub δ w obecności wzrastających stężeń badanego związku w postaci nieznakowanej. Radioizotopowa analiza funkcjonalna miała na celu określenie aktywności oraz efektywności badanych związków do stymulacji aktywności białka G poprzez wiązanie [35 S]GTP γ S w obecności rosnących stężeń badanego związku. Do doświadczeń radioizotopowych zastosowano specyficznych agonistów receptora μ - [(D-Ala²,NMePhe⁴,Gly⁵-ol)enkefalina]-([3 H]DAMGO; 48,9 Ci/mmol) oraz δ - ([tyrosyl-3,5- 3 H]deltorfina II) ([3 H]DELT II; 28,0 Ci/mmol). Oba radioligandy zostały użyte przez Zakład Biochemii Instytutu Badań Biologicznych Węgierskiej Akademii Nauk w Szeged. Do radioizotopowych badań funkcjonalnych jako radioligandu użyto [35 S]GTP γ S (guanozyna 5-O- [γ - 35 S]-trifosforan; 1204Ci/mmol) (Instytut Izotopów Ltd, Budapeszt).

3.1.2. Przygotowanie homogenatu z mózgu szczura

Homogenat z przodomózgowia szczura przygotowany został według metody opisanej przez Zadina i wsp. 1994 (Zadina i wsp., 1994). Szczury stada Wistar o masie 250g uśmiercano poprzez dekapitację pod znieczuleniem wziewnym mieszanką halotanu (Narcotan[®], Leciva, Czechy) i tlenu w proporcji 0,5:3,5 vol%. Przodomózgowia pobrane od dwóch osobników umieszczano w 20 objętościach lodowatego roztworu 50mM Tris-HCl (pH 7,4). Następnie tkanka rozdrabniana była przy użyciu szklanego homogenizatora poprzez ruchy tłoczka w górę i w dół aż do uzyskania jednolitej zawiesiny. Otrzymany homogenat był wirowany przez 15min. w 4°C przy 48 000 x g. Następnie zlewano supernatant nad osadu, który ponownie zawieszano w 20 objętościach buforu Tris-HCl (pH 7,4). Później homogenat inkubowano przez 30min. w łaźni wodnej z wytrząsaniem w temp. 25,5°C. Po inkubacji powtórzono procedurę wirowania i zawieszania w buforze Tris-HCl (pH 7,4). Przed porcjowaniem pobierano

100µl zawiesiny w celu oznaczenia stężenia białka. Resztę homogenatu błonowego zamrażano w temp. -20 °C. Pomiaru stężenia białka wykonano metodą Bradforda przy użyciu zestawu odczynników Dc Protein Assay (Bio-Rad, USA). Absorbancję mierzono w aparacie FluOstar-Omega Multidetecion Microplate Reader (BMG Labtech, Germany) przy długości fali 750nm.

3.1.3. Kompetycyjne wiązanie radioizotopowe

Przygotowany preparat błonowy (0,2-0,5mg białka/1ml) inkubowano w buforze zawierającym 50mM Tris-HCl (pH 7,4) (Sigma-Aldrich, Niemcy), 0,1 mg/ml BSA (Sigma-Aldrich, Niemcy), 30 µg/ml bacitracyny (SERVA Electrophoresis, Niemcy), 30 µM bestatyny (Sigma-Aldrich, Niemcy), 10 µM kaptoprilu (Fluka, Szwajcaria) oraz 0,1mM fluorku fenylometylosulfonylu (PMSF) (Sigma-Aldrich, Niemcy) w obecności 0,5nM [³H]DAMGO lub [³H]DELT II oraz wzrastających stężeń analizowanego związku (10^{-10} – 10^{-6} M) w całkowitej objętości 1ml przez 60min. w temp. 25,5°C w łaźni wodnej z wytrząsaniem. W celu określenia niespecyficznego wiązania użyto 10µM roztworu naltreksonu (Sigma-Aldrich, Niemcy). Wszystkie próbki przygotowywane były w dwóch powtórzeniach. Inkubacja przerywana była poprzez szybką filtrację przez bibułę filtracyjną o gradacji GF/B (Whatman, USA) nasączoną uprzednio roztworem 0,5% polietyloiminy (PEI) (Sigma-Algrich, Niemcy) w celu zminimalizowania niespecyficznego wiązania wolnego radioliganda do powierzchni filtra oraz przeciwdziałaniu wypłukania radioliganda związanego w receptorem błonowym. Następnie filtry były przemywane 6ml lodowatego roztworu 0,9% NaCl w celu zatrzymania reakcji. Filtrację prowadzono za pomocą aparatu M-24 Cell Harvester (Brandel, USA). Następnie, pojedyncze krążki bibuły umieszczane były oddzielnie na 24-dołkowych płytach Clear PET 24-well Flexible Microplate (Perkin Elmer, USA) i zalewane 1ml płynu OptiPhase Supermix Cocktail (Perkin Elmer, USA). Stopień radioaktywności mierzony był w liczniku scyntylicyjnym MicroBeta LS, Trilux (PerkinElmer, USA). Krzywe wiązania sporządzono według modelu regresji nieliniowej i przedstawiono jako zależność % specyficznego wiązania radioligandu od logarytmu stężenia związku wyrażonego w molach. Powinowactwo badanych związków wyrażone zostało parametrem IC₅₀.

3.1.4. Analiza [³⁵S]GTPγS

Homogenat błonowy (10-15μg białka/1ml) inkubowano w buforze Tris-EDTA (pH 7,4) zawierającym 50 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Niemcy), 1 mM EDTA (Molar Chemicals KFT, Węgry), 3 mM MgCl₂ (Molar Chemicals KFT, Węgry) w obecności 0,05 nM [³⁵S]GTPγS oraz wzrastających stężeń (10⁻¹¹ – 10⁻⁵) badanego peptydu i 100μM GDP w całkowitej objętości 1ml. Inkubację prowadzono przez 60min. w temp. 30°C. Wiązanie niespecyficzne określone zostało przy użyciu 10μM nieznakowanego GTPγS. Wszystkie próbki przygotowywane były w trzech powtórzeniach. Związany oraz wolny radioligand rozdzielano za pomocą 3-krotnej filtracji w buforze Tris-EDTA (pH 7,4) przez bibułę filtracyjną o gradacji GF/B (Whatman, USA) uprzednio namoczoną w buforze Tris-EDTA (pH 7,4). Filtrację prowadzono za pomocą aparatu M-24 Cell Harvester (Brandel, USA). Następnie pojedyncze krążki bibuły nasączone były płynem Ultima Gold MV (Perkin Elmer, USA) i umieszczane w szklanych probówkach. Radioaktywność mierzona była w liczniku scyntylicyjnym TRI-CARB 2100TR (Canberra-Packard, Perkin-Elmer Life Science, USA). Krzywe wiązania sporządzono według modelu regresji nieliniowej i przedstawiono jako zależność % specyficznej stymulacji wiązania [³⁵S]GTPγS od logarytmu stężenia związku wyrażonego w molach. Wyniki przedstawione zostały jako wartość E_{max} określająca maksymalny możliwy efekt związku przy całkowitym wysyceniu receptorów.

3.2 Doświadczenia *in vitro*

3.2.1 Hodowla komórek czerniaka linii B16F0

Mysie komórki czerniaka linii B16F0 przechowywane były przed eksperymentem w banku w ciekłym azocie. Po rozmrożeniu komórek w łaźni wodnej w temp. 37°C były one hodowane w standardowym podłożu MEM (Biomed, Polska) z dodatkiem 10% bydlęcej surowicy płodowej (FBS) (Gibco, USA) oraz 1% penicyliny/streptomycyny (Gibco, USA). Komórki utrzymywano w atmosferze 5% CO₂ w temperaturze 37°C w inkubatorze firmy SANYO Electric Biomedical CO, model MCO-18AIC aż do uzyskania 80% konfluencji komórek. Komórki oddzielone były od płytki hodowlanej poprzez trypsynizację w roztworze zawierającym 0,05% trypsyny oraz 0,02% EDTA (Gibco, USA).

Następnie komórki były wirowane przez 3min. przy 1000rpm a po zlaniu supernatantu zawieszane w 5ml pożywki. W celu określenia liczebności komórek pobierano 200 μ l zawiesiny i umieszczano w liczniku NucleoCounter NC-100 (Chemometec, USA). Do implantacji jednego zwierzęcia przygotowywano zawiesinę zawierającą 2×10^5 komórek zawieszonych w 25 μ l płynu PBS (Biomed, Polska).

3.2.2 Test przeżywalności komórek

Ludzkie komórki czerniaka linii MEW 155 lub fibroblastów AW/4 wysiewano na 24-dołkowych płytkach MultiwellTM (Becton Dickinson, USA) w ilości 5tys. komórek/dołek zawieszonych w 315 μ M pożywki MEM (Biomed, Polska). Następnie do hodowli dodawane były analizowane związki w stężeniach 20 μ M oraz 100 μ M w objętości 35 μ l 0,9% NaCl. Komórki kontrolne otrzymywały równą objętość rozpuszczalnika. Doświadczenie przeprowadzane było w trzech powtórzeniach. Komórki hodowano następnie przez 96 godz. w atmosferze 5% CO₂ w temperaturze 37°C w inkubatorze firmy SANYO Electric Biomedical CO, model MCO-18AIC. Po upływie 96h 350 μ l pożywki zbierano do opisanych probówek typu eppendorf a komórki odrywano od podłoża przy pomocy 150 μ l roztworu zawierającego 0,05% trypsyny oraz 0,02% EDTA (Gibco, USA) i inkubowano od 3 do 5min. Komórki zawieszane w roztworze trypsyny przenoszono do probówek z zebraną pożywką i doprowadzano do objętości 1ml. W celu określenia całkowitej liczby komórek pobierano 60 μ l zawiesiny i dodawano do niej 60 μ l buforu lizującego Lysis Buffer (ChemoMetec Reagent A) oraz 60 μ l buforu stabilizującego Stabilizing Buffer (ChemoMetec Reagent B) w celu uzyskania wolnych jąder komórkowych. Otrzymany lizat w objętości 50 μ l wstrzykiwano do kasety NucleoCasette opłaszczonej jodkiem propidyny (ChemoMetec, Dania). Następnie zliczano ilość zabarwionych jodkiem propidyny wolnych jąder komórkowych w liczniku NucleoCounter NC-100 za pomocą programu komputerowego NucleoView (ChemoMetec, Dania). W celu określenia liczby komórek martwych 60 μ l zawiesiny komórek rozcieńczano 120 μ l pożywki MEM i zliczano w taki sam sposób jak całkowitą liczbę komórek. Liczba komórek żywych stanowiła różnicę pomiędzy całkowitą liczbą komórek a liczbą komórek martwych.

3.3 Doświadczenia *in vivo*

Wszystkie doświadczenia z udziałem zwierząt doświadczalnych zostały przeprowadzone po uzyskaniu zgody lokalnej komisji etycznej. Doświadczenia wykonywane były przez osoby posiadające odpowiednią zgodę Dyrektora Instytutu na prowadzenie doświadczeń na zwierzętach.

3.3.1 Zwierzęta

Wszystkie doświadczenia *in vivo* przeprowadzone były na samcach myszy szczepu C₅₇BL₆. Implantacja komórek nowotworowych wykonywana była na zwierzętach 5 - lub 6 - tygodniowych, natomiast doświadczenia farmakologiczne przeprowadzane były na osobnikach 8 - lub 9 -tygodniowych. Zwierzęta trzymane były po 4-5 sztuk w plastikowych klatkach z wyściółką z drobno zmielonych trocin przy temperaturze otoczenia $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i wilgotności $55^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ z kontrolowanym dostępem do paszy oraz niekontrolowanym dostępem do wody. Mysiom przeznaczonym do doświadczenia na 12h przed eksperymentem zabierano pokarm. Dostęp do wody pozostawał nieograniczony. Zwierzęta utrzymywane były w systemie sztucznej doby przy 12-godzinnym oświetleniu. Protokół doświadczalny został zaakceptowany przez lokalną komisję etyczną ds. doświadczeń na zwierzętach.

3.3.2 Implantacja komórek czerniaka linii B16F0

Implantacja komórek nowotworowych odbywała się metodą nieoperacyjną aby uniknąć procesu pooperacyjnego gojenia się rany oraz wywołania stanu zapalnego mogącego zaburzać obraz lokalnej reakcji na podane komórki nowotworowe. W celu implantacji komórek nowotworowych myszy były delikatnie przytrzymywane za skórę na karku aż do uspokojenia się zwierzęcia. Następnie komórki nowotworowe wstrzykiwane były podskórnie w podszewę lewej tylnej kończyny w okolicy śródstopia (kończyna ipsilateralna) w ilości 2×10^5 komórek/25 μl przy użyciu strzykawki insulinowej BD Micro-Fine + U-40 (Becton Dickinson & Company, Niemcy). W doświadczeniach farmakologicznych kończyna prawa (kontralateralna) nastrzykiwana była 25 μl płynu PBS.

3.3.3 Preparatyka mikroskopowa

Materiał wyjściowy do badań mikroskopowych stanowiły kończyny ipsilateralne i kontralateralne pobrane od myszy uśmiercanych w poszczególnych dniach wzrostu guza nowotworowego (9, 13, 16, 19 oraz 24 dzień) oraz kończyny kontrolne. Świeżo pobrany materiał umieszczano na 72h w utrwalaczu EAFS (200ml etanolu 96%, 25ml kwasu octowego lodowatego, 50ml 40% formaldehydu, 225ml 0,9% NaCl) a następnie 7 dni w odczynniku oksfordzkim (50ml 40% formaldehydu, 4,35g NaCl, 100ml 90% kwasu octowego, 450ml wody destylowanej). Tkanę poddano stopniowemu odwadnianiu poprzez umieszczanie jej w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu. Próbkę umieszczano w 70% etanolu na 24h, w 90% przez 7h oraz w 96% przez noc. Następnie tkanę umieszczano na 20min. w roztworze czystego ksylenu. Preparaty umieszczane były następnie w kasetkach do zatapiania w naczyniach z ciekłą parafiną i pozostawiane w cieplarni w temp 62°C na czas 1h. Po wyjęciu i zastygnięciu parafiny preparaty przed procesem krojenia umieszczane były w zamrażarce. Krojenie preparatów odbywało się na mikrotomie ustawionym na grubość krojenia 4µm. Skrawki umieszczane były w kąpeli wodnej w 37°C w celu ich rozprostowania a następnie nanoszone były na szkiełka podstawowe pokryte 2% alkoholowym roztworem aminopropylotrietoksyilanu (Sigma-Aldrich, Niemcy) i suszone przez 1h w 60°C w cieplarni. W celu dokonania barwienia hematoksyliną i eozyną skrawki na szkiełkach umieszczano w roztworze ksylenu w celu usunięcia parafiny, następnie w szeregu malejących stężeń alkoholu etylowego (100%, 95%, 80%, 70%) a na końcu przemywano wodą destylowaną. Preparaty umieszczano na 8min. w kuwecie z 5% roztworem hemotoksyliny (Merck Milipore, Niemcy), a następnie przemywano przez 5min. bieżącą wodą wodociągową i zanurzano ponownie w wodzie destylowanej. Preparaty umieszczano na 30s. w roztworze 1% kwaśnego roztworu HCl, przemywano wodą wodociągową przez 1 min. i umieszczano w 0,2% roztworze wody amoniakalnej na 30s. Po przemyciu wodą wodociągową przez 5min. preparaty przemywane były 95% alkoholem etylowym (10 zanurzeń) i umieszczane w kuwecie z 0,25 % roztworem eozyny Y (Merck Milipore, Niemcy) na 30s. Następnie preparaty poddawano odwadnianiu przy pomocy dwóch płukań po 5min. w 95% alkoholu etylowym oraz

dwóch płukań w roztworze ksylenu. W końcowym etapie procedury наносono na powierzchnię skrawków medium zamykające Surgipath DPX Mountant (Leica Biosystems, Niemcy).

3.3.4. Test podeszwowy oraz test cofania ogona

Przed jakimikolwiek procedurami behawioralnymi myszy były przyzwyczajane do pokoju doświadczalnego, eksperymentatora oraz aparatury w celu zminimalizowania stresu. Testy behawioralne wykonywane były zawsze w fazie jasnej i przez tę samą osobę. Próg bólowy oraz poziom analgezji nadrženiowej i obwodowej określany był w teście podeszwowym (Hargreaves i wsp. 1988). Analgezja typu rdzeniowego określana była w teście cofania ogona (D'Amour i Smith 1941) przy użyciu aparatu Plantar Test and Tail Flick Analgesia Meter (IITC Life Science Inc., USA). W teście podeszwowym myszy owijane były w kawałek bawełnianej tkaniny do poziomu przepony tak aby tylne kończyny oraz ogon pozostawały w swobodnym kontakcie ze szklaną platformą aparatu. Procedura ta miała na celu bezstresowe unieruchomienie oraz ujednoczenie pozycji, w której znajdowały się zwierzęta w chwili pomiaru. Następnie na podeszwę tylnej kończyny nakierowywana była wiązka światła widzialnego o intensywności równej 6 w 10-stopniowej skali aparatu pomiarowego. Dzięki umieszczoneму pod platformą lustru można było swobodnie obserwować zachowanie zwierzęcia. Pomiar zatrzymywano manualnie w momencie wystąpienia charakterystycznego lizania kończyny bądź jej cofnięcia. W pierwszej kolejności stymulowano kończynę lewą, a następnie prawą, w odstępach 10s. Pomiar wykonywano trzykrotnie. Ucieczka od bodźca była uznawana za reakcję niespecyficzną i pomiar był powtarzany. Czas uzyskany od momentu zadziałania bodźca do momentu reakcji behawioralnej na ból określany był mianem latencji wyrażonej w sekundach. W przypadku kończyny kontrolnej (kontralateralnej) latencja wynosiła średnio 4,5s. a ipsilateralnej ok. 3s. W teście cofania ogona wiązka światła widzialnego drażniła spodnią stronę ogona w połowie jego długości aż do momentu cofnięcia lub wstrząśnięcia ogona. Podstawowa latencja w teście cofania ogona wynosiła poniżej 3s.

3.3.5 Pomiar rozwoju termicznej hiperalgezji

W doświadczeniu mającym na celu obserwację spadku progu bólowego na skutek implantacji komórek czerniaka B16F0, manifestującego się wystąpieniem przeczulicy na bodziec termiczny (termiczna hiperalgezja), analizowano dwie grupy eksperymentalne. W grupie badanej (grupa „B16F0”) kończynę ipsilateralną inokulowano zawiesiną komórek B16F0. Grupa kontrolna (grupa „PBS”) została nastrzyknięta w podszwę ipsilateralnej kończyny płynem PBS (Biomed, Polska). Kończyny kontralateralne w obu grupach zostały jedynie nakłute igłą bez wstrzyknięcia płynu PBS. W celu określenia momentu wystąpienia objawów bólowych, poziom progu bólowego mierzony był przed implantacją komórek nowotworowych lub iniekcji PBS (dzień 0) a następnie w odstępach 3-4 dniowych. Począwszy od dnia 13-go, pomiary wykonywane były codziennie aż do dnia 24-go, kiedy konieczna była eutanazja zwierząt. Wyniki otrzymane w teście podszwowy i cofania ogona przedstawione zostały jako wartości średnie wyrażone w sekundach \pm SE.

3.3.6 Pomiar objętości kończyny

W celu określenia stopnia rozwoju nowotworu, mierzono objętość kończyny ipsilateralnej oraz kontralateralnej myszy. Mierzono grubość oraz szerokość kończyny na wysokości śródstopia za pomocą suwmiarki o dokładności 0,02mm. Objętość wyliczano ze wzoru: $V = (t \times w^2) \times 0,52$, gdzie V – objętość; t – grubość kończyny; w – szerokość kończyny. Pierwszego pomiaru dokonano w dniu 13, kolejnego w 16; następnie objętość kończyny mierzono codziennie aż do dnia 24. Wyniki przedstawione zostały jako surowe dane wyrażone w mm^3 .

3.3.7 Doświadczenia farmakologiczne

Doświadczenia farmakologiczne przeprowadzane były 19 dni po implantacji komórek czerniaka B16F0 na osobnikach, u których zaobserwowano spadek latencji inokulowanej kończyny o co najmniej 30%. Osobniki nie spełniające tego kryterium były odrzucane. W doświadczeniach ostrych podawano badane związki w systemie jednorazowej iniekcji do żyły ogonowej. W doświadczeniach przewlekłych w 12 dniu po

implantacji komórek czerniaka związku podawano codziennie przez 7 dni o tej samej porze dnia (godz. 9.00). Pomiar stopnia analgezji w opisanych wyżej testach behawioralnych wykonywany był w dniu pierwszym po podaniu związku oraz w dniu siódmym, kończącym doświadczenie. Pomiar latencji w doświadczeniach farmakologicznych dokonywane były przed podaniem (podstawowa latencja) oraz 5, 15, 30, 60, 120min. po podaniu związku. Maksymalny czas ekspozycji na bodziec termiczny wynosił w teście podszwowy 12s a w teście cofania ogona 10s aby nie dopuścić do poparzenia tkanki. Grupy badane oraz kontrolne liczyły 8-10 osobników. Efekt analgetyczny przedstawiono jako % maksymalnego możliwego efektu analgetycznego (%MPE) zgodnie ze wzorem: $\%MPE = [T_2 - T_1] / [C_{off} - T_1] \times 100\%$, gdzie: T_1 – czas latencji przed podaniem związku; T_2 – czas latencji po podaniu związku; C_{off} – czas maksymalnej ekspozycji na bodziec. Całkowity efekt analgetyczny dla każdego związku został przedstawiony jako powierzchnia pod krzywą (AUC) i wyrażony w jednostkach arbitralnych $AUC \pm SE$.

3.4 Związki użyte w doświadczeniach *in vivo*

W doświadczeniach na zwierzętach zastosowano następujące związki:

1. **Bifalina** [(Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH-)₂] oraz **peptyd 5320** [(Tyr-D-Thr-Gly-Phe-NH-)₂] w postaci chlorowodoru podawana była dożylnie w dawkach 10μmol/kg, 15μmol/kg oraz 20μmol/kg. **Peptyd 5311** [(Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH-NH)₂=CO] w postaci chlorowodoru podawany był dożylnie w dawkach 21,4μmol/kg, 31,2μmol/kg i 64,2μmol/kg.
2. **Morfina** w postaci chlorowodoru podawana była drogą dożylną w dawce 20μmol/kg w doświadczeniach ostrych lub w dawce 46,8μmol/kg drogą dootrzewnową w doświadczeniach przewlekłych.
3. **Naltrekson** - (17-(Cyklopropylometrylo)-4,5-epoksy-3,14-dihydroksy-morfinian-6-on) (Sigma-Aldrich, Niemcy) jako niespecyficzny antagonist receptorów opioidowych podawany był dootrzewnowo w postaci chlorowodoru w dawce 26,4μmol/kg 15min. przed iniekcją najwyższej dawki badanego peptydu opioidowego.

4. **Metylojodek naloksonu** - jodek (5 α ,17R)-4,5-Epoksy-3,14-dihydroksy-17-metylo-6-okso-17-(2-propenylo)-morphinianu) (Sigma-Aldrich, Niemcy) jako nieselektywny antagonist receptorów opioidowych zlokalizowanych w obwodowym układzie nerwowym podawany był dootrzewnowo w dawce 21,3 μ mol/kg 15min. przed podaniem najwyższej dawki badanego peptydu opioidowego.

Wszystkie wymienione powyżej związki rozpuszczano w roztworze 0,9% NaCl.

3.5 Statystyczna analiza wyników

Otrzymane wyniki doświadczeń analizowane były za pomocą programu GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Wyniki przedstawione zostały jako wartości średnie \pm SE. Różnice w wartościach powinowactwa, efektywności oraz potencjału badanych związków analizowane były za pomocą cząstkowego testu F po uprzedniej analizie normalności rozkładu przy użyciu testu D'Agostina i Pearsona. W doświadczeniach *in vivo* krzywe zależności efektu analgetycznego od czasu analizowane były za pomocą dwukierunkowej analizy wariancji z powtarzanymi pomiarami (dwukierunkowa RM-ANOVA) oraz testu *post-hoc* Bonferroniego. Analiza różnic w całkowitym efekcie analgetycznym (opisującym efektywność związków) wyrażonym w arbitralnych jednostkach powierzchni pod krzywą (AUC) oparta była na jednokierunkowej analizie wariancji (jednokierunkowa ANOVA) oraz teście *post-hoc* Newmana-Keulsa lub teście *t*-Studenta. Poziom istotności statystycznej ustalony został na poziomie $\alpha = 0,05$.

4. WYNIKI

4.1 Charakterystyka morfologiczna i behawioralna mysiego modelu bólu nowotworowego

Implantacja 2×10^5 komórek czerniaka linii B16F0 do podszwy tylnej kończyny syngenicznego szczepu myszy C₅₇Bl₆ spowodowała stopniowy rozrost tkanki nowotworowej w miejscu iniekcji (Ryc. 7). Do dnia 9 na kończynie ipsilateralnej niezauważalne były zmiany patologiczne. Natomiast, dnia 13 na podszwie kończyny

ipsilateralnej pojawiły się pierwsze rozsiane, bądź skupione, ciemne przebarwienia melaninowe. W obrazie mikroskopowym zmiany nowotworowe miały charakter ograniczony między skórą właściwą a tkanką mięśniową. Komórki nowotworowe były w większości owalne z widoczną cytoplazmą a ich jądra okrągłe (Ryc. 10). Z dniem 16 ciemne przebarwienia były już bardzo widoczne, tworząc uwypuklenie na spodniej stronie kończyny. Obszar zmiany patologicznej w preparatach był niewiele większy niż w dniu 13. Komórki nowotworowe miały kształt bardziej wrzecionowaty oraz nie wykazywały takiego stopnia upakowania jak w dniu 13 (Ryc. 11). W dniu 19 w obrazie mikroskopowym tkanka nowotworowa zajmowała znaczną część obserwowanego obszaru w polu widzenia, następował zanik mięśni i pojawienie się złogów melaniny. Nie obserwowano natomiast zmian martwiczych (Ryc. 12). W dniu 22 tkanka nowotworowa zajmowała już większą część kończyny ipsilateralnej zniekształcając ją i utrudniając jej naturalny kontakt z podłożem. W ostatnim, 24 dniu obserwacji kończyna wykazywała znaczny stopień deformacji spowodowany daleko posuniętym rozrostem masy guza nowotworowego uniemożliwiającym swobodne poruszanie się zwierzęcia.

W preparatach mikroskopowych widoczne były rozległe obszary martwicze oraz pola złogów melaninowych. Kończyna kontralateralna nastrzyknięta płynem PBS przez cały okres trwania doświadczenia pozostawała bez żadnych zmian patologicznych o charakterze nowotworowym (Ryc. 13). Implantacja komórek czerniaka miała wpływ na istotne zwiększenie się objętości kończyny ipsilateralnej w okresie trwania obserwacji w porównaniu do kończyny nastrzykniętej płynem PBS ($F_{1,40} = 45,75$; $p < 0,001$) (Ryc. 8) (Tab. 2). Ponadto, objętość kończyny ipsilateralnej zmieniała się w czasie w porównaniu do kończyny przeciwstawnej ($F_{9,360} = 50,95$; $p < 0,001$). W pierwszym dniu obserwacji nie zauważono różnic w objętości pomiędzy obiema kończynami, jednak począwszy od dnia 16 zaobserwowano pewną tendencję wzrostu objętości kończyny ipsilateralnej. Różnice w objętości kończyn osiągnęły istotność statystyczną dopiero w dniu 20 po implantacji i widoczne były do końca okresu obserwacyjnego. Jednokierunkowa RM ANOVA wykazała również zwiększenie się objętości kończyny ipsilateralnej w grupie badanej „B16F0” w czasie ($F_{9,20} = 10,61$; $p <$

0,001). Różnica w objętości kończyn ipsilateralnych uwidoczniła się pomiędzy dniami 22 a 23 ($p < 0,01$) oraz 23 a 24.

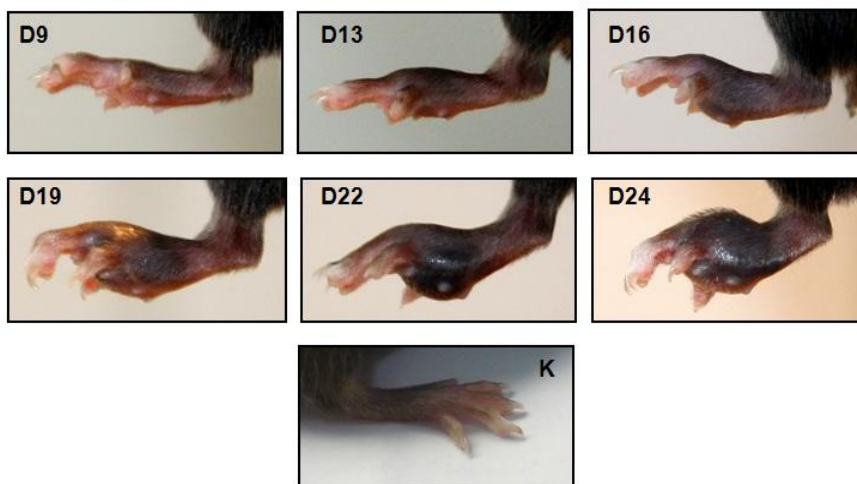
Konsekwencją stopniowego rozrostu tkanki nowotworowej było pojawienie się objawów termicznej hiperalgezji, objawiającej się obniżeniem progu bólowego w odpowiedzi na bolesny bodziec termiczny u myszy z grupy badanej „B16F0” (Ryc. 9 A). Wykazano różnicę w latencji kończyny ipsilateralnej pomiędzy grupą badaną „B16F0” a kontrolną „PBS” ($F_{1,88} = 192,5$; $p < 0,001$) oraz pomiędzy kończyną ipsilateralną a kontralateralną myszy z grupy badanej ($F_{1,94} = 238,1$; $p < 0,001$) (Tab. 2). Ponadto zmienność latencji zależna była od czasu od momentu implantacji komórek nowotworowych ($F_{14,88} = 30,89$; $p < 0,001$). Nie zaobserwowano natomiast różnicy w latencji pomiędzy kończyną kontralateralną grupy badanej oraz kontrolnej ($F_{1,88} = 1,10$; $p > 0,05$) a także zmian latencji w teście cofania ogona ($F_{1,88} = 1,4$; $p = 0,24$) (Ryc. 9 B). Test *post-hoc* wielokrotnych porównań Bonferroniego wykazał, iż w dniu 15 po implantacji komórek nastąpił istotny 14,5% spadek latencji pomiędzy kończynami ipsilateralnymi grupy badanej a kontrolnej. Także pomiędzy kończyną ipsilateralną a kontralateralną w grupie badanej „B16F0” zaobserwowano statystycznie istotny 15,6% spadek latencji 16 dni po implantacji komórek czerniaka. Bardzo wyraźny spadek latencji (o 38,2%) zaobserwowano w kończynie ipsilateralnej w grupie „B16F0” 17 dni od implantacji komórek nowotworowych w odniesieniu do kończyny kontralateralnej. Latencja kończyny ipsilateralnej w dniu 17 po implantacji różniła się także statystycznie od latencji obserwowanej w dniu 16. Spadek latencji widoczny był także w porównaniu do kończyny ipsilateralnej grupy kontrolnej „PBS” i wynosił 45,4%. W kolejnych dniach latencja w kończynach ipsilateralnych grupy badanej „B16F0” utrzymywała się już na stałym niskim poziomie aż do dnia zakończenia doświadczenia. Pomiar latencji oraz objętości guza zebrane zostały w Tabeli 2.

Tabela 2 Wartości latencji oraz średnia objętość kończyny ipsilateralnej i kontralateralnej w grupie badanej „B16F0”.

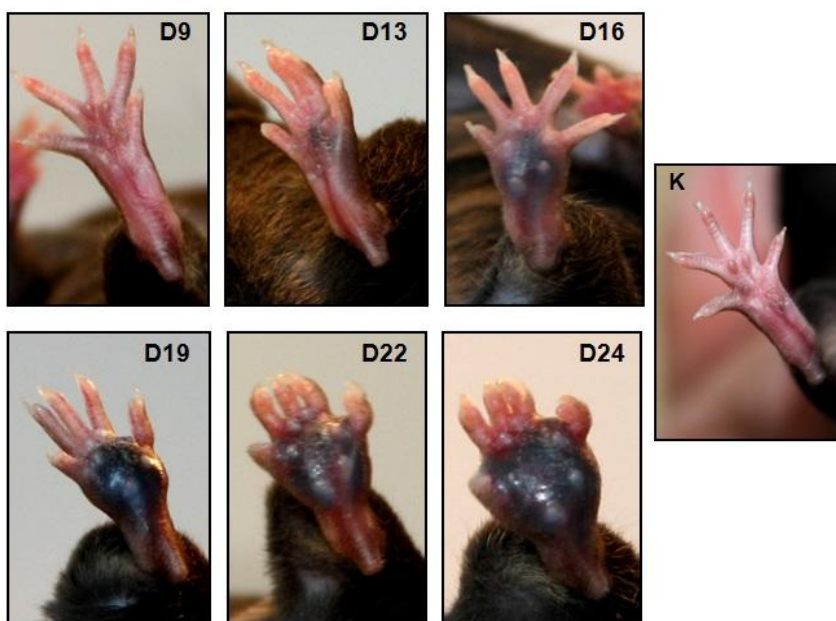
dzień	kończyna ipsilateralna		kończyna kontralateralna	
	śr. latencja[s] ±SE	śr.obj (mm ³) ±SE	śr. latencja[s] ±SE	śr.obj (mm ³) ±SE
1	3,74 ± 0,09	–	3,64 ± 0,09	–
5	3,88 ± 0,09	–	3,77 ± 0,10	–
9	3,75 ± 0,10	–	3,51 ± 0,09	–
13	3,65 ± 0,10	12,5 ± 1,2	3,75 ± 0,13	14,5 ± 0,4
14	3,50 ± 0,10	–	3,66 ± 0,10	–
15	3,39 ± 0,08	–	3,53 ± 0,10	–
16	2,86 ± 0,09 **	23,7 ± 3,2	3,39 ± 0,10	14,0 ± 0,5
17	2,10 ± 0,08 ***	31,2 ± 4,2	3,40 ± 0,08	14,0 ± 0,5
18	2,19 ± 0,07 ***	41,2 ± 4,7	3,54 ± 0,11	13,4 ± 0,5
19	2,19 ± 0,08 ***	53,9 ± 6,4	3,52 ± 0,11	15,4 ± 0,6
20	2,18 ± 0,08 ***	72,2 ± 8,8 ⁺⁺⁺	3,56 ± 0,12	15,3 ± 0,7
21	2,14 ± 0,07 ***	92,0 ± 11,5 ⁺⁺⁺	3,60 ± 0,09	16,3 ± 0,6
22	2,30 ± 0,08 ***	130,0 ± 18,2 ⁺⁺⁺	3,26 ± 0,08	16,9 ± 0,5
23	2,07 ± 0,10 ***	181,2 ± 24,0 ⁺⁺⁺	3,65 ± 0,12	17,0 ± 0,3
24	1,96 ± 0,09 ***	226,7 ± 29,0 ⁺⁺⁺	3,82 ± 0,15	16,8 ± 0,5

Symbole * oraz + oznaczają statystycznie istotne różnice odpowiednio w latencji i objętości kończyny ipsilateralnej w porównaniu do kończyny kontralateralnej grupy „B16F0”. Analiza statystyczna wykonana została przy użyciu dwukierunkowej RM ANOVA oraz testu post-hoc Bonferroniego. Poziom istotności statystycznej przedstawiony został następująco: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$.

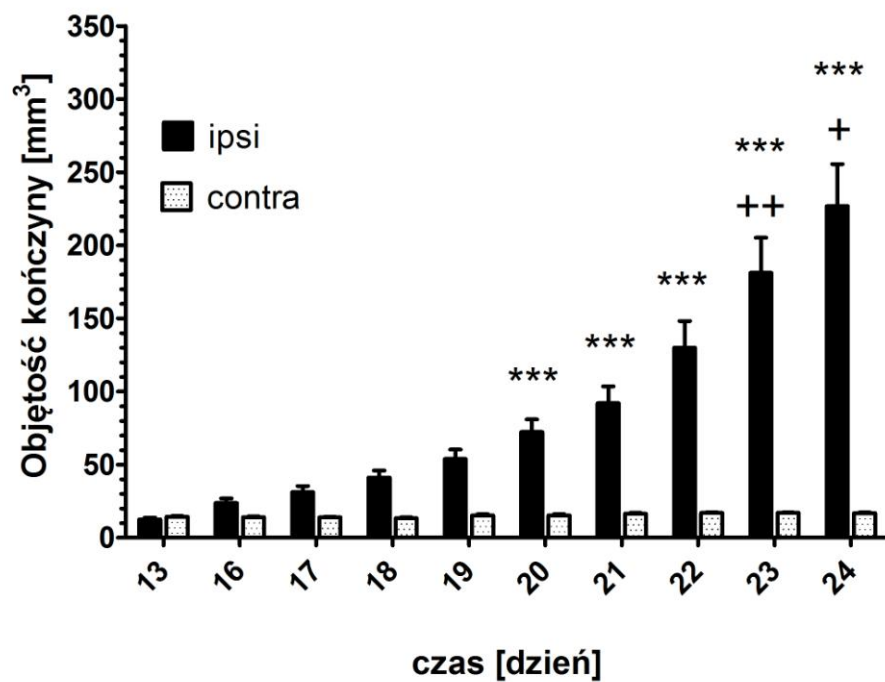
A



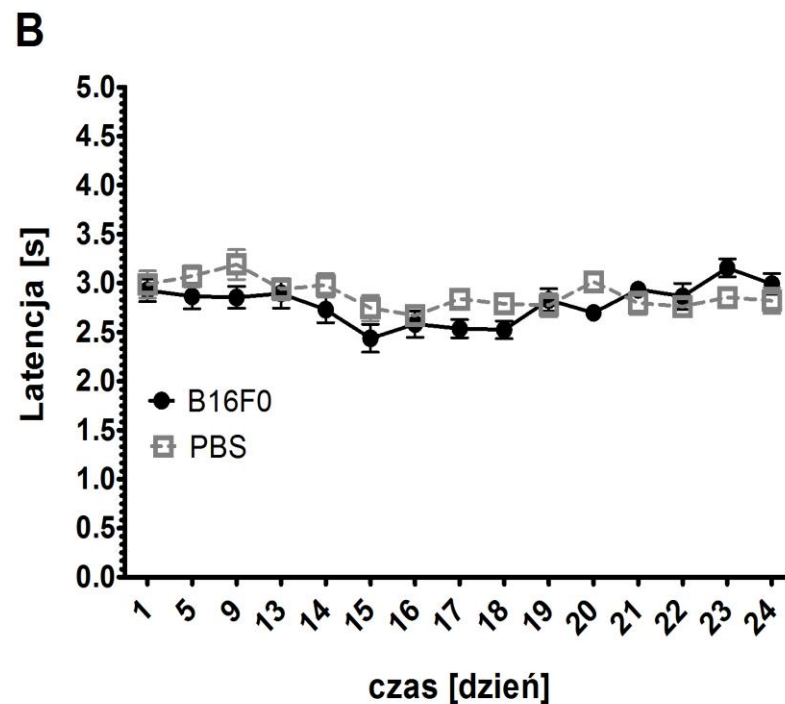
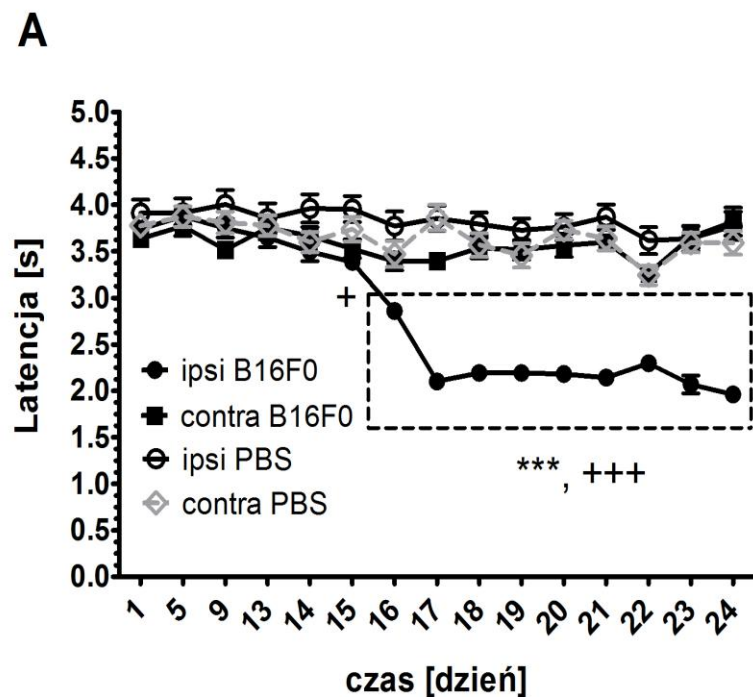
B



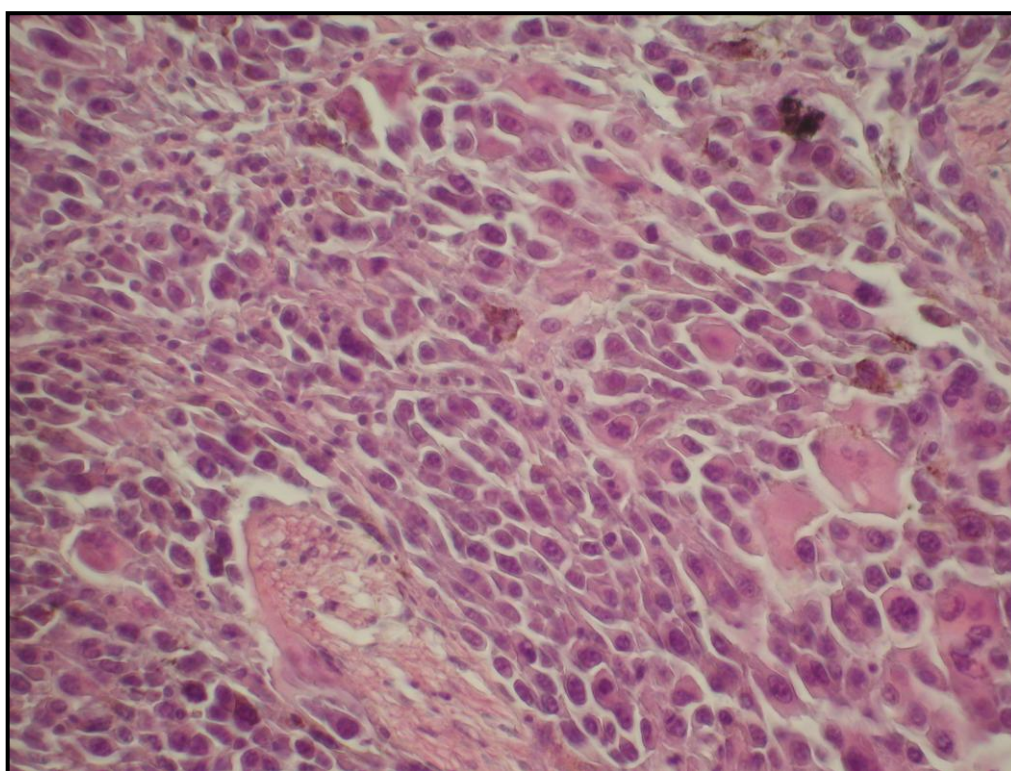
Ryc. 7. Rozwój masy guza na spodniej stronie stopy kończyny ipsilateralnej w wybranych dniach obserwacji (D9-D24) oraz obraz kończyny kontralateralnej (K). (A) widok w poziomie (B) widok z przodu.



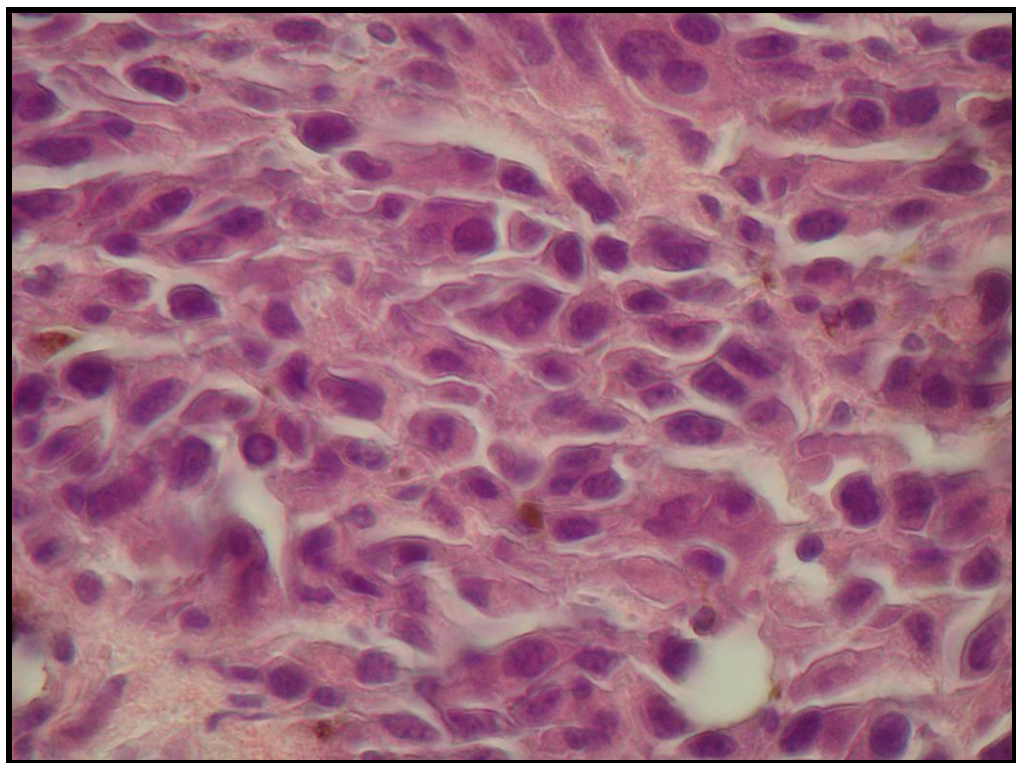
Ryc. 8. Objętość kończyny ipsilateralnej (ipsi) inokulowanej komórkami czerniaka linii B16F0 oraz kontralateralnej (contra) nastrzykniętej PBS (n= 21). Analiza statystyczna wykonana została przy użyciu dwukierunkowej RM ANOVA oraz testu post-hoc Bonferroniego. Poziom istotności statystycznej oznaczono jako: *** $p < 0,001$ (ipsi vs. contra); + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ (ipsi 22 vs. ipsi 23), + $p < 0,05$ (ipsi 23 vs. ipsi 24).



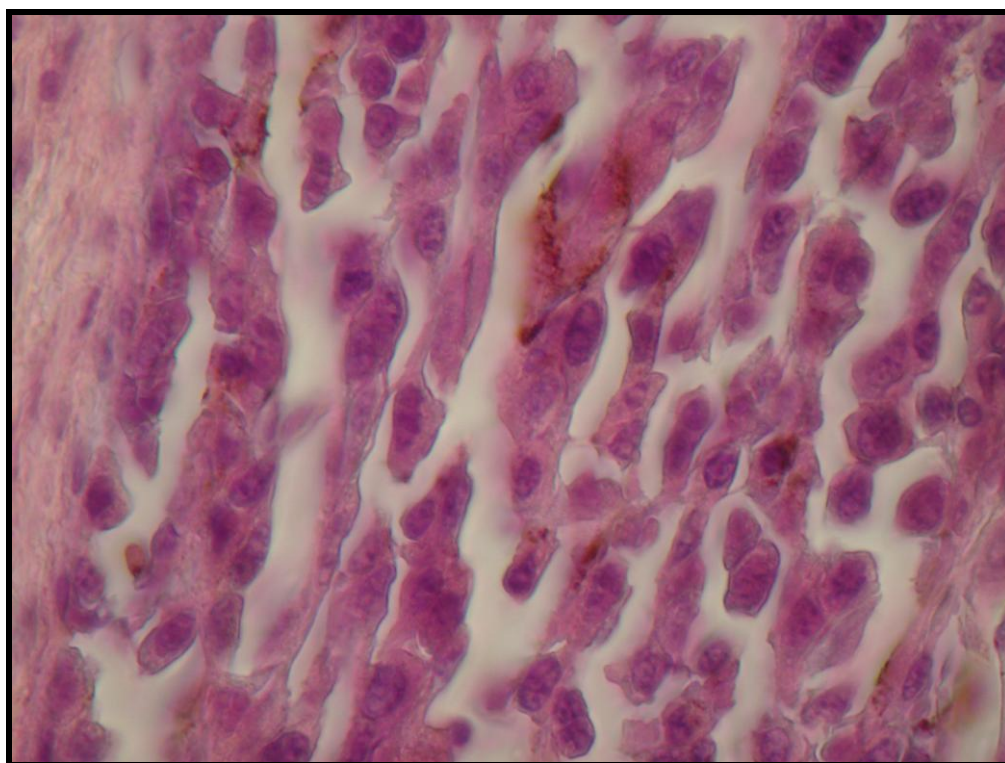
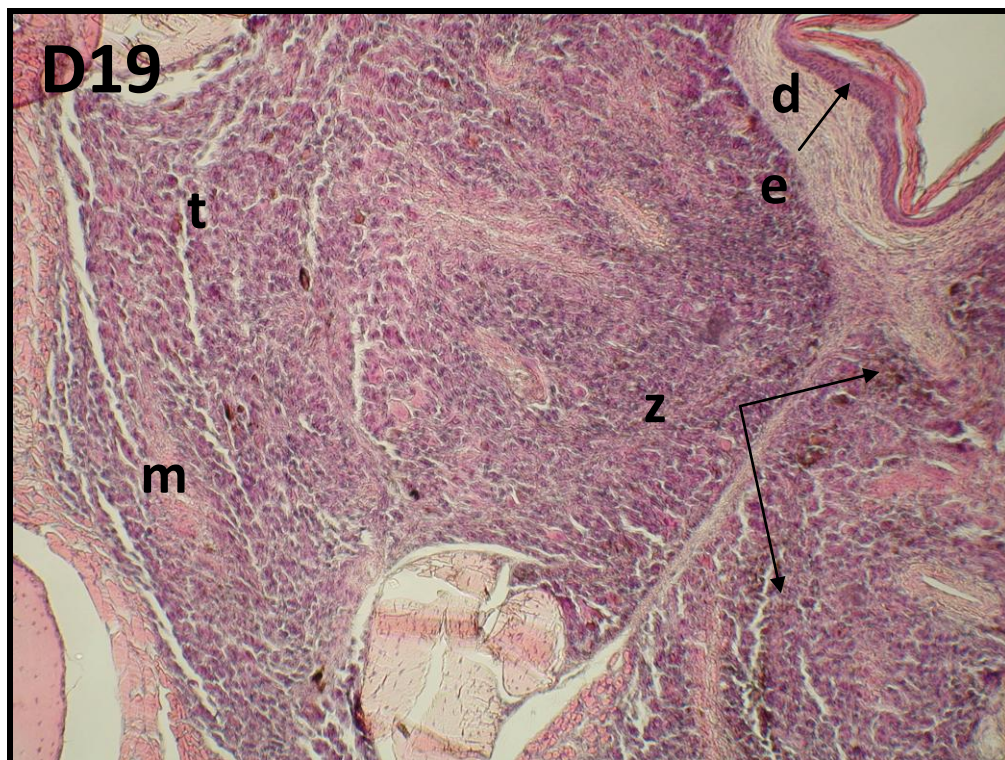
Ryc. 9. Czas latencji w teście podeszwowym (A) w kończynach ipsilateralnej (ipsi) oraz kontralateralnej (contra) oraz teście cofania ogona (B) u myszy grupy inokulowanej komórkami czerniaka linii B16F0 w podeszwę tylną kończynę (grupa B16F0, n = 48) oraz myszy kontrolnych nastrzykniętych PBS (grupa PBS, n = 42). Analiza statystyczna wykonana została przy użyciu dwukierunkowej RM ANOVA oraz testu post-hoc Bonferroni. Poziom istotności statystycznej oznaczono jako: *** $p < 0,001$ (ipsi B16F0 vs. contra B16F0); + $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$ (ipsi B16F0 vs. ipsi PBS).



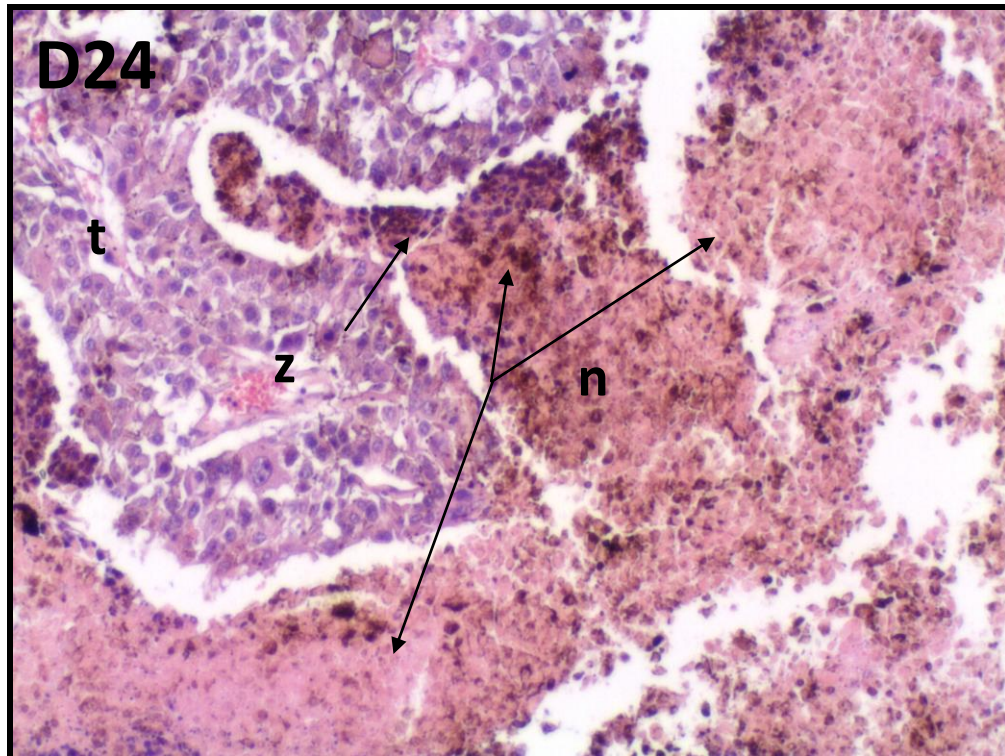
Ryc. 10. Barwienie hematoksylina/eozyna preparatów parafinowych kończyny ipsilateralnej w dniu 13 od implantacji komórek czerniaka linii B16F0 w powiększeniu 20x (zdjęcie u góry) oraz 40x powiększenie warstwy komórek nowotworowych (zdjęcie u dołu). Widok od strony podeszwy. Oznaczenia: m-włókna mięśniowe, d-skóra właściwa, t-komórki nowotworowe, e-naskórek.



Ryc. 11. Barwienie hematoksylina/eozyna preparatów parafinowych kończyny ipsilateralnej w dniu 16 od implantacji komórek czerniaka linii B16F0 w powiększeniu 40x (zdjęcie u góry) oraz 100x powiększenie warstwy komórek nowotworowych (zdjęcie u dołu). Widok od strony podeszwowej. Oznaczenia: m-włókna mięśniowe, d-skóra właściwa, t-komórki nowotworowe, e-naskórek.



Ryc. 12. Barwienie hematoksylina/eozyna preparatów parafinowych kończyny ipsilateralnej w dniu 19 od implantacji komórek czerniaka linii B16F0 w powiększeniu 20x (zdjęcie u góry) oraz 100x powiększenie warstwy komórek nowotworowych (zdjęcie u dołu). Widok od strony podeszwowej. Oznaczenia: m-włókna mięśniowe, d-skóra właściwa, t-komórki nowotworowe, e-naskórek, z-złogi melaniny.



Ryc. 13. Barwienie hematoksylina/eozyna preparatów parafinowych kończyny ipsilateralnej w dniu 24 od implantacji komórek czerniaka linii B16F0 (zdjęcie u góry) oraz kończyny kontralateralnej (zdjęcie u dołu) w powiększeniu 20x. Widok od strony podeszwowej. Oznaczenia: m-włókna mięśniowe, d-skóra właściwa, t-komórki nowotworowe, e-naskórek, z-złogi melanimy, n-obszary martwicze.

4.2 Farmakodynamika bifaliny i peptydów 5320 oraz 5311 w kompetycyjnych i funkcjonalnych badaniach radioizotopowych

Kompetycyjna, radioizotopowa metoda oceny powinowactwa bifaliny oraz jej analogów 5320 i 5311 wykazała, że związki te w stężeniach nanomolowych efektywnie wypierały wiązanie się z receptorami specyficznych agonistów [³H]DAMGO i [³H]DELT II. Analiza statystyczna z zastosowaniem cząstkowego testu F wykazała różnicę w powinowactwie pomiędzy bifaliną, peptydami 5320 i 5311 oraz morfiną wobec receptora μ ($F_{3,88} = 15,00$; $p < 0,001$) oraz receptora δ ($F_{3,91} = 50,19$; $p < 0,001$) (Ryc. 14).

Morfina charakteryzowała się prawie 30-krotnie wyższymi wartościami powinowactwa wobec receptora opioidowego μ niż δ . Wprawdzie bifalina również wykazywała większe powinowactwo do receptorów μ , jednak powinowactwo do receptorów δ było jedynie 4,8-krotnie niższe. Analogi bifaliny: 5320 oraz 5311 wykazywały porównywalne powinowactwo wobec obu typów receptorów opioidowych. Wartości powinowactwa $\log IC_{50}$ peptydu 5320 dla receptora μ wyniosła $-8,68 \pm 0,10M$ a dla receptora δ : $-8,4 \pm 0,10M$. W przypadku peptydu 5311 wartości te wynosiły odpowiednio $-8,83 \pm 0,11M$ oraz $-8,6 \pm 0,09M$. Bifalina najsilniej wiązała się do receptora μ spośród wszystkich analizowanych związków osiągając wartość $\log IC_{50}$ równą $-9,50 \pm 0,09M$. Natomiast powinowactwo peptydu 5320 wobec receptora μ było porównywalne do powinowactwa morfiny wynoszącego $-8,46 \pm 0,10M$ oraz mniejsze w porównaniu do związku macierzystego. Z kolei analog 5311 wykazywał niższe wartości powinowactwa w porównaniu z bifaliną wobec receptora μ , podczas gdy wiązał się z nim silniej niż morfina. W przypadku receptorów δ bifalina oraz jej analizowane analogi charakteryzowały się silniejszym powinowactwem wobec tego typu receptora niż morfina. Wartości powinowactwa $\log IC_{50}$ wobec receptora δ wyniosły $-7,0 \pm 0,08M$ dla morfiny oraz $-8,81 \pm 0,10M$ dla bifaliny. Analog 5320 charakteryzował się jednak niższymi wartościami powinowactwa wobec receptora δ niż bifalina, natomiast powinowactwo analogu 5311 było porównywalne do związku macierzystego.

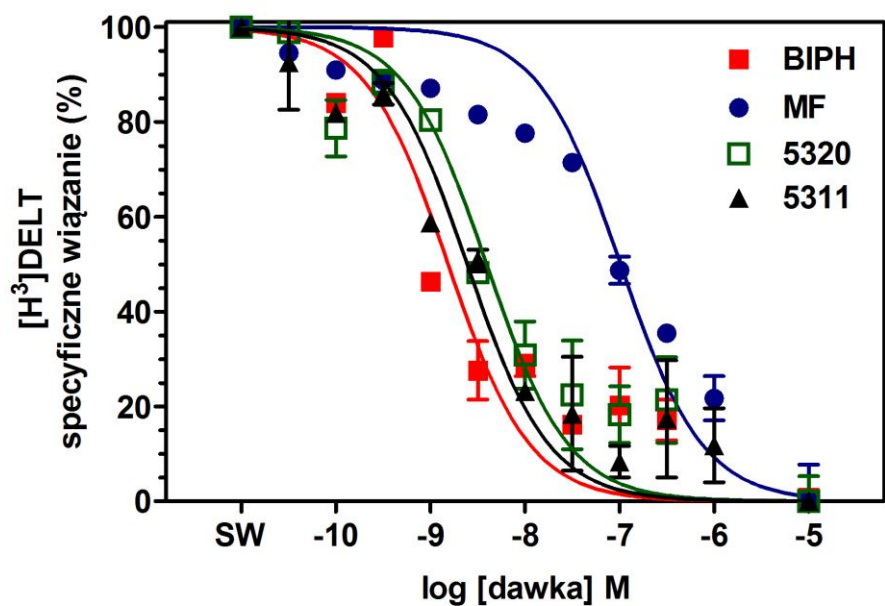
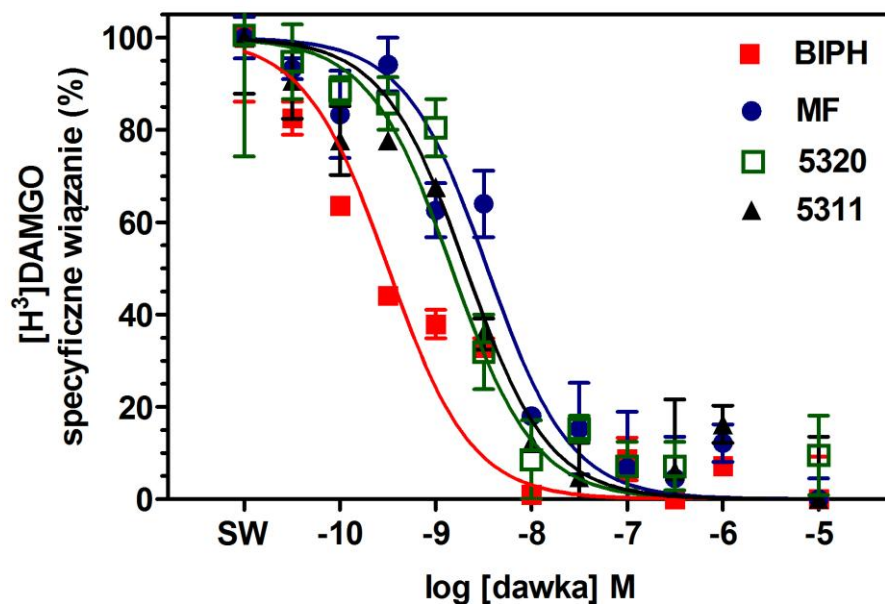
Podobnie jak w przypadku powinowactwa cząstkowy test F wykazał również różnicę w efektywności ($F_{4,85} = 22,04$; $p < 0,001$) oraz potencjale analgetycznym ($F_{4,85} = 4,41$;

$p < 0,01$) bifaliny i jej analogów w porównaniu do morfiny oraz DAMGO w funkcjonalnej analizie [^{35}S]GTP γ S (Ryc. 15). Zarówno bifalina jak i analogi 5320 i 5311 stymulowały aktywację białka G z efektywnością (E_{\max}) sięgającą wartości charakterystycznych dla pełnych agonistów – odpowiednio: $238,9 \pm 4,94\%$, $222 \pm 4,87\%$ oraz $225,2 \pm 4,99\%$. Powyższe wartości E_{\max} przewyższały te uzyskane dla morfiny i DAMGO, których efektywność wyniosła odpowiednio $142,2 \pm 3,37\%$ oraz $187,0 \pm 4,92\%$. Bifalina, 5320 oraz 5311 wykazały niższe wartości potencjału analgetycznego (odpowiednio: - $7,06 \pm 0,08\text{M}$, - $6,97 \pm 0,082\text{M}$ oraz - $7,00 \pm 0,091\text{M}$) w stosunku do morfiny, którego wartość $\log\text{IC}_{50}$ wyniosła - $7,78 \pm 0,21\text{M}$. Wartości potencjału badanych peptydów opioidowych przewyższały natomiast wartość - $6,50 \pm 0,13\text{M}$ uzyskaną dla DAMGO. Stymulacja białek G przez analogi bifaliny została całkowicie odwrócona przez niespecyficznego antagonistę receptorów opioidowych – naltrekson. Wartości powinowactwa i potencjału ($\log\text{IC}_{50}$ i IC_{50}) oraz efektywności (E_{\max}) badanych związków zostały podane w Tabeli 3.

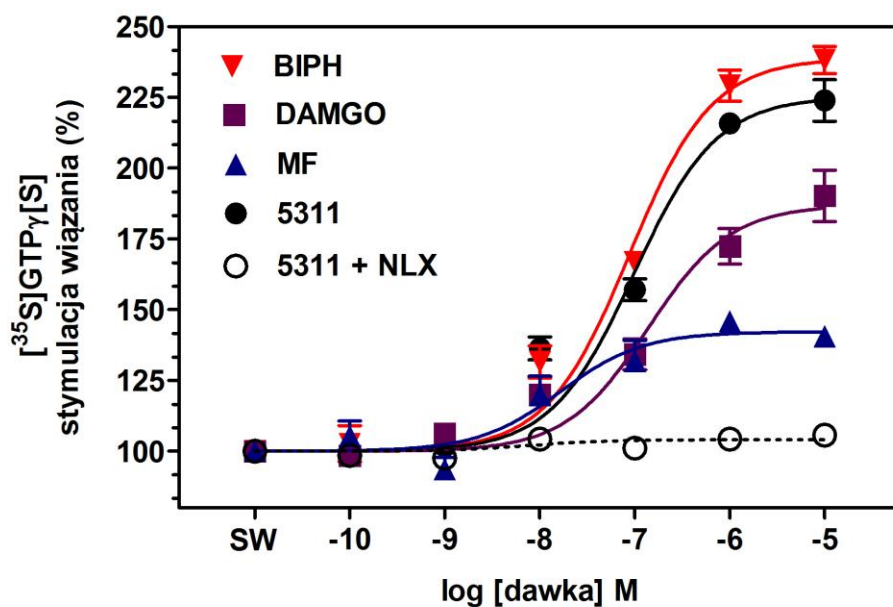
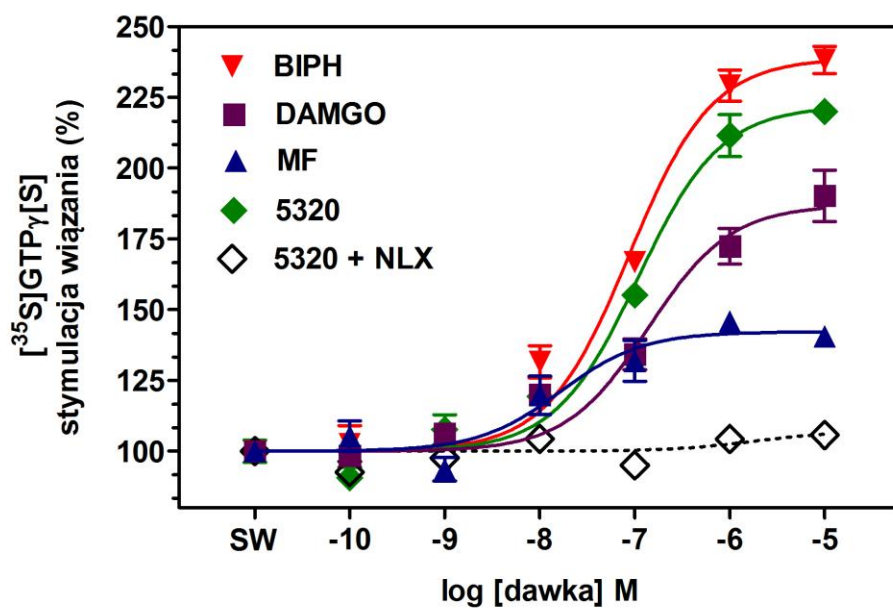
Tabela 3. Powinowactwo badanych związków wobec receptorów opioidowych μ i δ oraz wartości efektywności i potencjału analgetycznego badanych związków w analizie zależnej od liganda aktywacji białek G.

	$[^3\text{H}]$ DAMGO, receptor μ	$[^3\text{H}]$ DELT II, receptor δ	$[^{35}\text{S}]$ GTP γ S	$[^{35}\text{S}]$ GTP γ S
związek	log IC ₅₀ ± SE, (IC ₅₀ , nM)		log IC ₅₀ ± SE	E _{max} ± SE (%)
bifalina	- 9,50 ± 0,09 (0,32) ***	- 8,81 ± 0,10 (1,54) ***	- 7,06 ± 0,08 * (**)	238,9 ± 4,94 ^{###, +++}
morfina	- 8,46 ± 0,10 (3,47)	- 7,0 ± 0,08 (102,5)	- 7,78 ± 0,21 [*]	142,2 ± 3,37
DAMGO	-	-	- 6,50 ± 0,13	187,0 ± 4,92
5320	- 8,68 ± 0,10 (2,07) ^{nsm, [***]}	- 8,4 ± 0,10 (3,93) ***, [*]	- 6,97 ± 0,082 ** , nsb , (**)	222 ± 4,87 ^{###, +++} , [*]
5311	- 8,83 ± 0,11 (1,47) * , [***]	- 8,6 ± 0,09 (2,44) *** , nsb	- 7,00 ± 0,091 * , nsb , (**)	225,2 ± 4,99 ^{###, +++}
5320 + NLX	-	-	- 5,73 ± 1,55	107,1 ± 7,44
5311 + NLX	-	-	- 5,35 ± 0,60	104,1 ± 1,40

Symbole *, [*] i (*) oznaczają statystycznie istotną różnicę w powinowactwie/potencjału peptydów (log IC₅₀) w porównaniu do odpowiednio morfiny, bifaliny lub DAMGO. Poziom istotności statystycznej został przedstawiony jako: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; [*] p < 0,05; [***] p < 0,001; (*) p < 0,05, (**) p < 0,01; nsm, nsb, nsd - brak istotności statystycznej w porównaniu do kolejno morfiny, bifaliny, DAMGO. Symbole # , + oznaczają statystycznie istotną różnicę w efektywności peptydów (E_{max}) w porównaniu odpowiednio do morfiny i DAMGO. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem cząstkowego testu F. Poziom istotności statystycznej został przedstawiony jako: ## p < 0,01; ### p < 0,001; ++ p < 0,01, +++ p < 0,001 ns - brak istotności statystycznej.



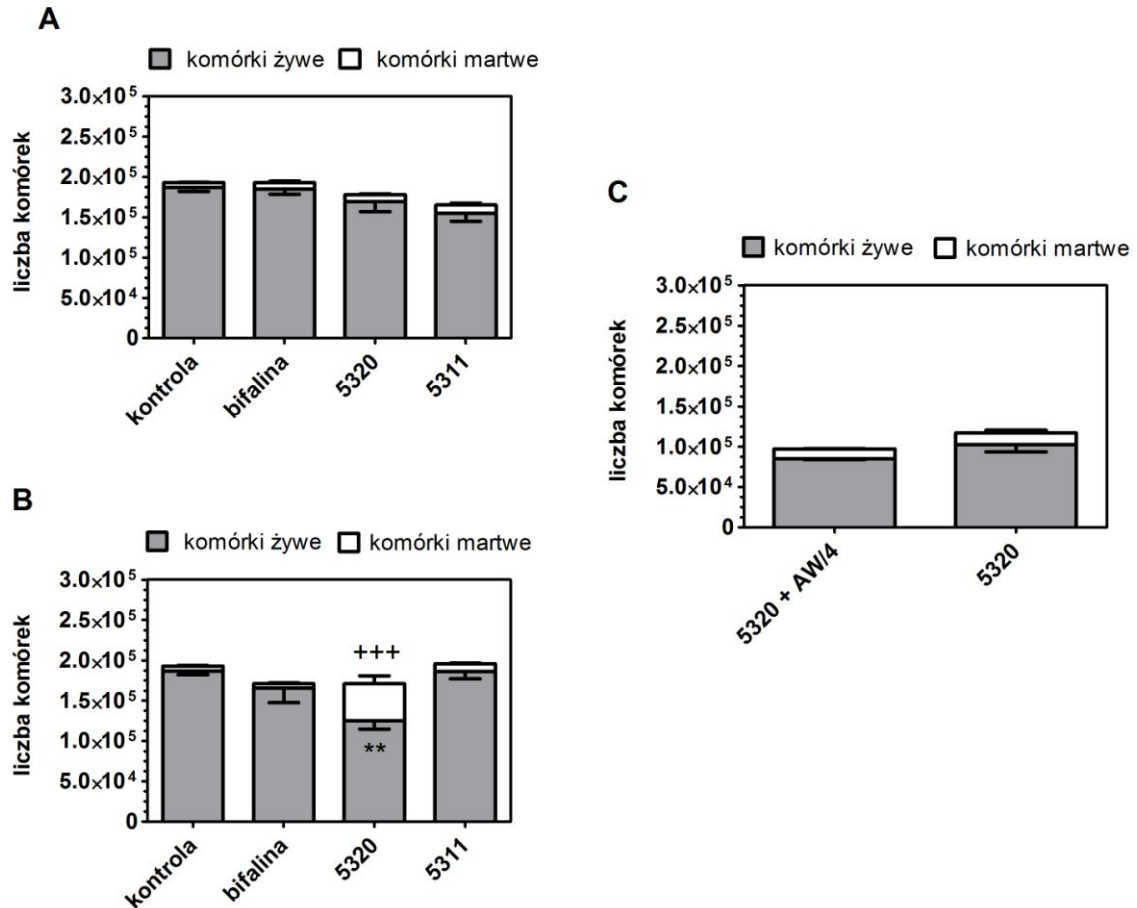
Ryc. 14. Kompetycyjne wypieranie wiązania $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ i $[^3\text{H}]\text{DELT}$ II przez badane związki. Preparat błonowy z przodomózgowie szczura inkubowany był w obecności 0,5 nM radioligandu w obecności wzrastających stężeń (10^{-10} – 10^{-5} M) bifaliny (BIPH) (■), morfiny (MF) (●), analogu 5320 (□) oraz analogu 5311 (▲). Wiązanie niespecyficzne określone zostało przy użyciu $10\mu\text{M}$ naltreksonu. Wiązanie specyficzne (SW) zostało oznaczone jako 100%. Wyniki zostały przedstawione jako średnie \pm SE.



Ryc. 15. Specyficzna stymulacja wiązania $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ przez badane związki. Preparat błonowy z przodomózgowia szczura inkubowany był w obecności 0,05 nM radioligandu w obecności wzrastających stężeń (10^{-10} – 10^{-5}M) bifaliny (BIPH) (\blacktriangledown), morfiny (MF) (\blacktriangle), analogu 5320 (\blacklozenge) oraz analogu 5311 (\bullet). Odwrócenie efektu stymulacji wiązania $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ przez analogi 5320 (\diamond) i 5311 (\circ) dokonane zostało przy użyciu 10^{-5}M naltreksonu. Wiązanie niespecyficzne określone zostało przy użyciu $100\mu\text{M}$ nieznakowanego $\text{GTP}\gamma\text{S}$. Wiązanie specyficzne (SW) zostało oznaczone jako 100%. Wyniki zostały przedstawione jako średnie \pm SE.

4.3 Skuteczność przeciwnowotworowa bifaliny i peptydów 5320 oraz 5311 *in vitro*

Skuteczność przeciwnowotworowa bifaliny oraz jej analogów została zbadana *in vitro* na hodowli komórek czerniaka ludzkiego linii MEW 155 traktowanych dawkami 20μM oraz 100μM analizowanych peptydów opioidowych. Jednokierunkowa ANOVA wykazała, iż podane do hodowli związki w dawce 20μmoli po 96h inkubacji nie spowodowały zmian w liczebności zarówno komórek żywych ($F_{3,8} = 2,94$; $p = 0,1$) jak i martwych ($F_{3,8} = 1,45$; $p = 0,3$) w porównaniu do komórek kontrolnych traktowanych roztworem soli fizjologicznej (Ryc. 16 A). W przypadku większej dawki - 100μM wykazano różnicę w liczbie żywych ($F_{4,10} = 11,35$; $p < 0,001$) oraz martwych ($F_{4,10} = 12,68$; $p < 0,001$) komórek MEW 155 w hodowli. Jedynie po inkubacji z 100μM peptydu 5320 zaobserwowano 33,03% spadek liczby żywych oraz 7,26-krotny wzrost liczby martwych komórek MEW 155 w odniesieniu do kontroli (Ryc. 16 B). Ta sama dawka analogu 5320 nie wpłynęła na zmianę liczby żywych (test *t*-Studenta $p = 0,123$) oraz martwych ($p = 0,55$) fibroblastów prawidłowych linii AW/4. W przypadku bifaliny oraz peptydu 5311 nie zaobserwowano statystycznie istotnej różnicy w liczbie komórek linii MEW 155 po ich inkubacji z 100μM stężeniami tychże związków.



Ryc. 16. Liczba żywych oraz martwych komórek czerniaka ludzkiego linii MEW 155 (A, B) po 96h inkubacji z 20 μ M (A) i 100 μ M (B) bifaliny, 5311, 5320 oraz liczba żywych oraz martwych komórek fibroblastów AW/4 (C) po 96h inkubacji z 100 μ M peptydu 5320. Analiza statystyczna wykonana została z użyciem jednokierunkowej ANOVA oraz testu post-hoc Newmana-Keulsa (A,B) oraz testu t-Studenta (C). Poziom istotności statystycznej przedstawiono następująco: ** $p < 0,01$ (liczba komórek żywych vs. kontrola); +++ $p < 0,001$ (liczba komórek martwych vs. kontrola).

4.3 Działanie analgetyczne bifaliny i peptydów 5320 oraz 5311 w teście podszwowym

Dwukierunkowa RM-ANOVA wykazała statystycznie istotny wpływ dożylnego podania trzech dawek: bifaliny ($F_{3,92} = 25,59$; $p < 0,001$), peptydu 5320 ($F_{3,92} = 36,61$; $p < 0,001$) oraz peptydu 5311 ($F_{3,89} = 8,0$; $p < 0,001$) na wydłużenie się czasu reakcji kończyny ipsilateralnej w odpowiedzi na termiczny bodziec bólowy (wyrażonej jako % MPE) w porównaniu do kontroli otrzymującej 0,9% NaCl (Ryc. 17 A, B, C). Podobnie jak

w przypadku kończyny implantowanej komórkami czerniaka, także w kończynie przeciwstawnej dożylnie podanie bifaliny ($F_{3,92} = 25,45$; $p < 0,001$), peptydu 5320 ($F_{3,92} = 28,06$; $p < 0,001$) oraz peptydu 5311 ($F_{3,89} = 16,59$; $p < 0,001$) wpłynęło na wzrost wartości %MPE w porównaniu do kontroli (Ryc. 18 A, B, C). Odpowiedź analgetyczna charakteryzowała się także zmiennością w czasie w grupie zwierząt, którym podawano bifalinę (kończyna ipsilateralna: $F_{5,92} = 74,47$; $p < 0,001$; kończyna kontralateralna: $F_{5,92} = 66,40$; $p < 0,001$), peptyd 5320 (kończyna ipsilateralna: $F_{5,92} = 33,70$; $p < 0,001$; kończyna kontralateralna: $F_{5,92} = 24,34$; $p < 0,001$) czy peptyd 5311 (kończyna ipsilateralna: $F_{5,89} = 25,46$; $p < 0,001$; kończyna kontralateralna: $F_{5,89} = 38,13$; $p < 0,001$). Po podaniu $26,4\mu\text{mol/kg}$ nieselektywnego antagonisty receptorów opioidowych - naltreksonu nastąpił zanik efektu analgetycznego a wartości %MPE osiągnęły wartości kontrolne, zarówno w kończynie ipsilateralnej (bifalina + NLX: $F_{1,46} = 0,003$; $p = 0,95$; peptyd 5320 + NLX : $F_{1,46} = 0,1$; $p = 0,75$; peptyd 5311 + NLX: $F_{1,46} = 1,0$; $p = 0,32$) jak i kontralateralnej (bifalina + NLX : $F_{1,46} = 0,01$; $p = 0,92$; peptyd 5320 + NLX : $F_{1,46} = 0,07$; $p = 0,79$; peptyd 5311 + NLX : $F_{1,46} = 0,71$; $p = 0,40$). Maksymalny dla bifaliny oraz peptydu 5311 efekt analgetyczny obserwowany był w 15 min. od podania dożylnego a w przypadku peptydu 5320 pół godziny po podaniu.

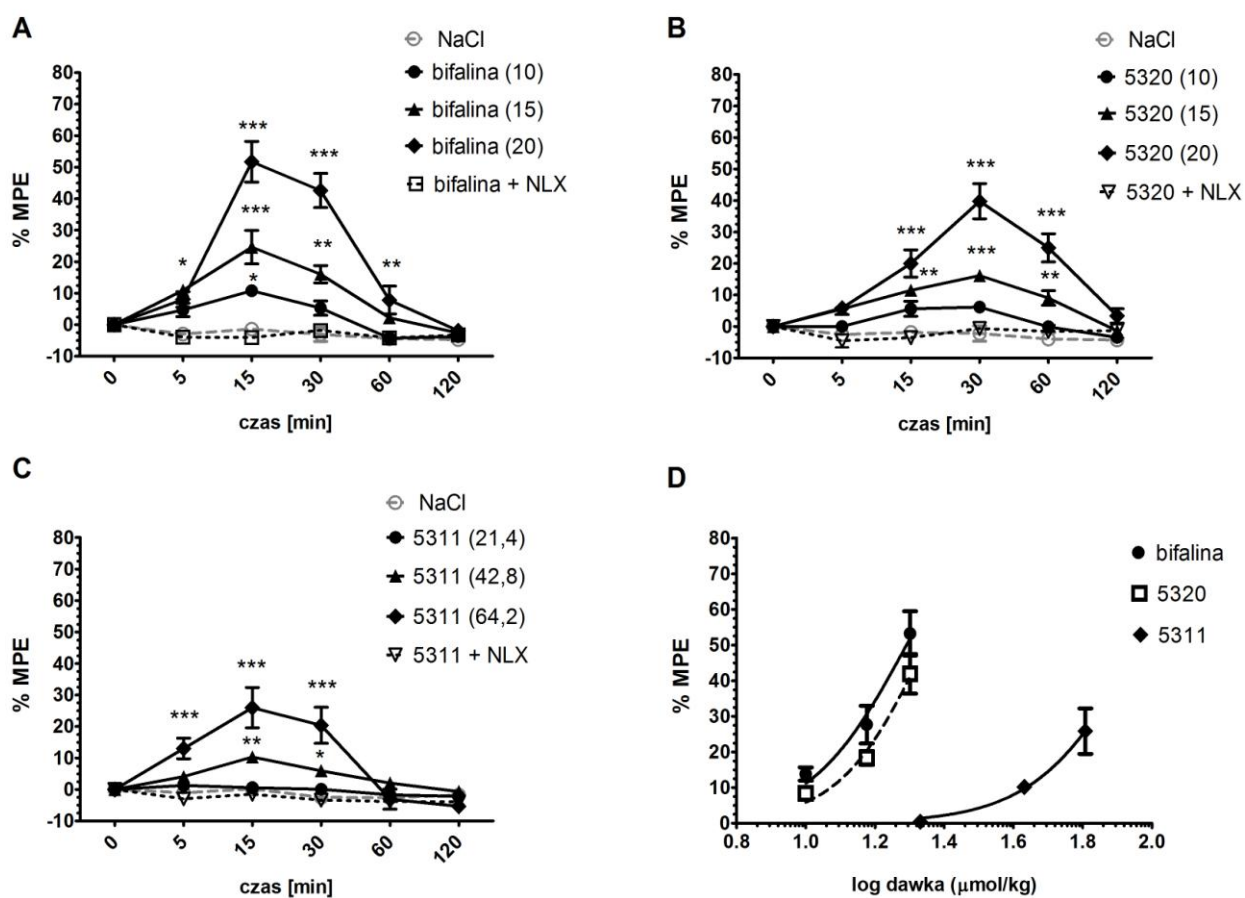
Po podaniu najniższej dawki bifaliny – $10\mu\text{mol/kg}$, zaobserwowano niewielki, lecz istotny statystycznie w odniesieniu do kontroli $12,2 \pm 2,6\%$ wzrost efektu analgetycznego w kończynie ipsilateralnej 15min. po iniekcji. W kończynie kontralateralnej odpowiedź analgetyczna na podanie bifaliny wyniosła natomiast $18,1 \pm 4,1\%$ MPE. W przypadku iniekcji $10\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5320 oraz $21,4\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5311 nie zaobserwowano wystąpienia efektu analgetycznego w kończynie ipsilateralnej w żadnym z badanych punktów czasowych. W kończynie kontralateralnej efekt analgetyczny widoczny był w grupie myszy otrzymujących $21,4\mu\text{mol/kg}$ i wyniósł w 15min. doświadczenia $17,7 \pm 4,2\%$ MPE, podczas gdy wartości %MPE myszy traktowanych $10\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5320 były na granicy istotności statystycznej w odniesieniu do kontroli.

Podanie bifaliny w ilości $15\mu\text{mol/kg}$ spowodowało wzrost wartości %MPE o $26,0 \pm 5,6\%$ w kończynie ipsilateralnej oraz o $39,2 \pm 6,9\%$ w kontralateralnej w kwadrans po podaniu oraz wydłużyło efekt analgetyczny do 30min. Moment pojawienia się efektu

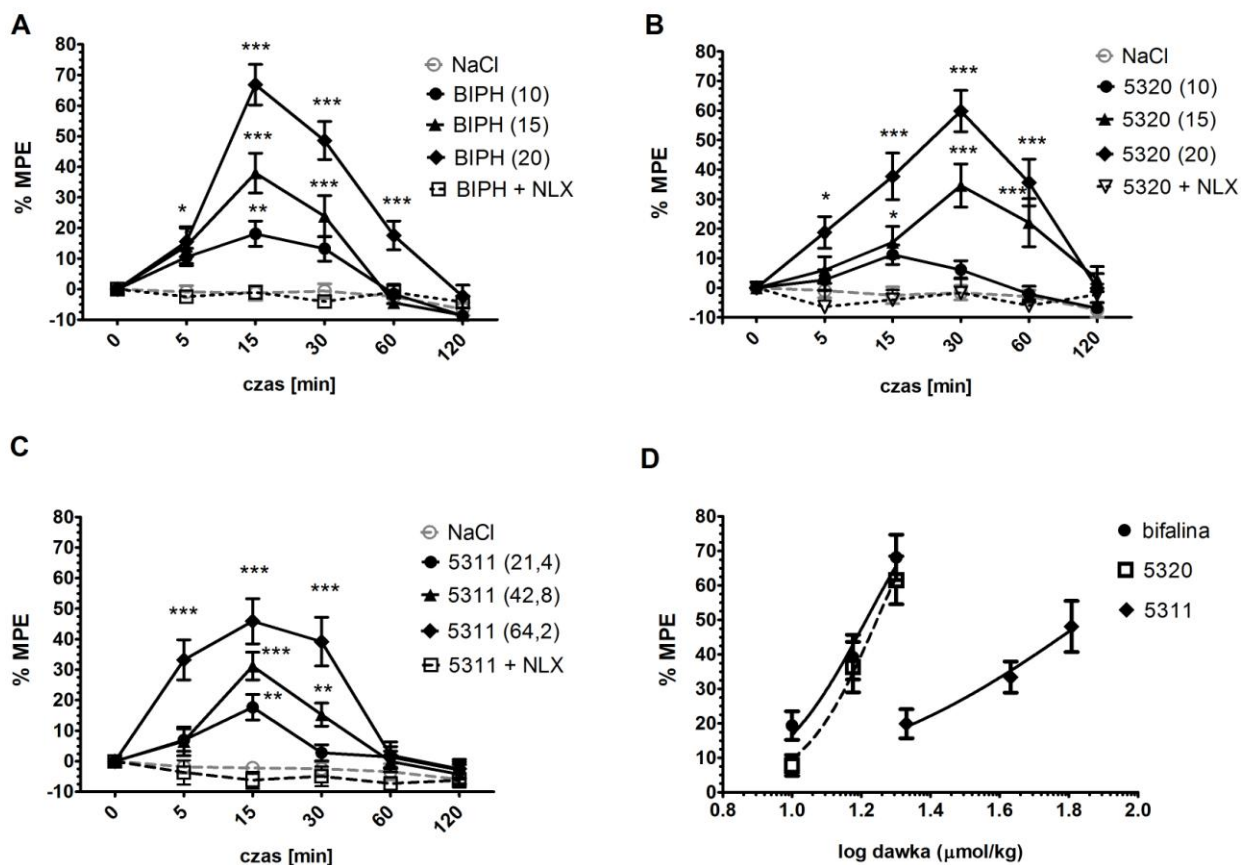
analgetycznego w kończynie ipsilateralnej w grupie myszy otrzymującej 15µmol/kg peptydu 5320 oraz 42,8µmol/kg peptydu 5311 przypadł również na 15min. od iniekcji, wynosząc odpowiednio $11,5 \pm 2,0\%$ oraz $10,3 \pm 1,6\%$ MPE. Pomiar odpowiedzi analgetycznej w kończynie kontralateralnej dały wartości %MPE rzędu $15,5 \pm 5,3\%$ dla peptydu 5320 oraz $31,2 \pm 4,5\%$ dla peptydu 5311. Analgeza wywołana przez peptyd 5311 w pośredniej dawce podobnie jak dla bifaliny trwała do pół godziny po podaniu w obydwu kończynach. Natomiast po godzinie od rozpoczęcia eksperymentu u myszy otrzymujących peptyd 5320 wartości %MPE pozostały większe o $13,01 \pm 3,1\%$ oraz o $25 \pm 8,4\%$ MPE od kontroli kolejno w kończynie ipsilateralnej i kontralateralnej. Zastosowanie 20µmol/kg bifaliny, 20µmol/kg peptydu 5320 oraz 64,2µmol/kg peptydu 5311 spowodowało wystąpienie najsilniejszego efektu przeciwbólowego względem kontroli obserwowanego w przeprowadzonym doświadczeniu. Odpowiedź przeciwbólowa kończyny ipsilateralnej w grupie myszy, którym podano bifalinę oraz peptyd 5311 pojawiła się już po 5min. od iniekcji a wartości %MPE wzrosły w odniesieniu do kontroli o $8,0 \pm 2,5\%$ dla bifaliny oraz o $13,2 \pm 3,3\%$ dla peptydu 5311. W kończynie kontralateralnej zanotowano natomiast wzrost o $16,4 \pm 5,3\%$ MPE w 5min. po podaniu peptydu 5320 oraz o $35,1 \pm 6,9\%$ MPE w przypadku peptydu 5311.

W przypadku myszy otrzymujących 20µmol/kg peptydu 5320 jego efekt biologiczny pojawił się dopiero w 15min. doświadczenia i wyniósł $20,0 \pm 4,3\%$ MPE w kończynie ipsilateralnej oraz $37,7 \pm 7,9\%$ MPE w kontralateralnej. Efekt analgetyczny bifaliny w tym czasie osiągnął szczytową wartość $51,7 \pm 6,5\%$ MPE w kończynie ipsilateralnej oraz $66,9 \pm 6,6\%$ MPE w kontralateralnej. Odpowiedź analgetyczna kończyn ipsilateralnych oraz kontralateralnych grupy zwierząt traktowanych 64,2µmol/kg peptydu 5311 osiągnęła w tym punkcie czasowym wartość $26 \pm 6,4\%$ MPE oraz $45,8 \pm 7,4\%$ MPE. W przypadku bifaliny oraz peptydu 5311 efekt analgetyczny w kończynie ipsilateralnej wykazywał tendencję spadkową w 30min. od rozpoczęcia doświadczenia, prezentując odpowiednio wartości $42,6 \pm 5,4\%$ oraz $20,3 \pm 5,7\%$ MPE. Podobny efekt spadkowy obecny był także dla obu peptydów w kończynie kontralateralnej i wyniósł $48,6 \pm 6,2\%$ dla bifaliny oraz $39,2 \pm 8\%$ MPE dla peptydu 5311. W grupie zwierząt, która otrzymała iniekcję peptydu 5320, efekt analgetyczny osiągnął najwyższą wartość: $39,7 \pm 5,6\%$ (kończyna ipsilateralna) i $59,8 \pm 7,0\%$ MPE

(kończyna kontralateralna) a czas jego trwania wyniósł 60min., osiągając $25,0 \pm 4,5\%$ (kończyna ipsilateralna) oraz $35,6 \pm 8,0\%$ MPE (kończyna kontralateralna). Godzinę po iniekcji również można było obserwować analgezję w kończynie ipsilateralnej o wartości $7,8 \pm 4,4\%$ MPE u osobników dostających bifalinę oraz wynoszący $17,5 \pm 4,7\%$ MPE efekt w kończynie kontralateralnej. W tym punkcie pomiarowym nie obserwowano już żadnej różnicy między peptydem 5311 a kontrolą.



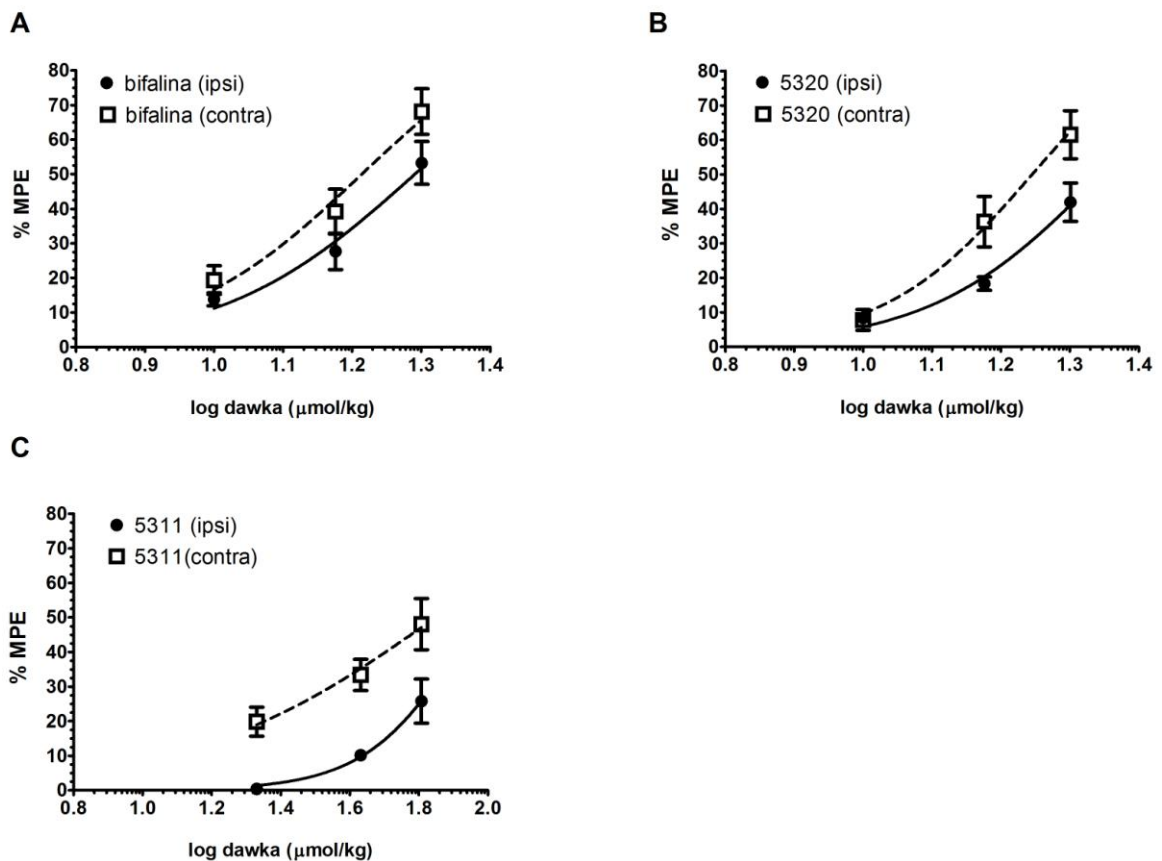
Ryc. 17. Efekt analgetyczny w zależności od czasu (A,B,C) oraz dawki (D) w kończynie ipsilateralnej po dożylnym podaniu trzech dawek: bifaliny, peptydu 5320, peptydu 5311 oraz po podaniu NLX wraz z najwyższą dawką badanego peptydu ($n = 8$). Dawki związków podane zostały w nawiasach w $\mu\text{mol/kg}$. Analiza statystyczna została wykonana z użyciem dwukierunkowej RM ANOVA oraz testu post-hoc Bonferroniego. Poziom istotności statystycznej oznaczono jako: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (związek vs. NaCl; dwukierunkowa RM ANOVA, test post-hoc Bonferroniego).



Ryc. 18. Efekt analgetyczny w zależności od czasu (A,B,C) oraz dawki (D) w kończynie kontralateralnej po dożylnym podaniu trzech dawek: bifaliny, peptydu 5320, peptydu 5311 oraz po podaniu NLX wraz z najwyższą dawką badanego peptydu ($n = 8$). Dawki związków podane zostały w nawiasach w $\mu\text{mol/kg}$. Analiza statystyczna została wykonana z użyciem dwukierunkowej RM ANOVA oraz testu post-hoc Bonferroniego. Poziom istotności statystycznej oznaczono jako: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (związek vs. NaCl).

Według sporządzonych krzywych zależności odpowiedzi analgetycznej od dawki (Ryc. 17 i 18 D), wartości ED_{50} dla badanych peptydów opioidowych w kończynie ipsilateralnej przedstawiały się następująco: bifalina: $19,54 \pm 1,06 \mu\text{mol/kg}$; peptyd 5320: $22,16 \pm 1,05 \mu\text{mol/kg}$; peptyd 5311: $92,0 \pm 1,2 \mu\text{mol/kg}$. W przypadku kończyny kontralateralnej 50% maksymalnego efektu osiągnięto przy $16,38 \pm 1,05 \mu\text{mol/kg}$ bifaliny, $17,6 \pm 1,05 \mu\text{mol/kg}$ peptydu 5320 oraz $70,6 \pm 1,2 \mu\text{mol/kg}$ peptydu 5311. Analiza statystyczna wykazała, iż nie było różnic w potencjale analgetycznym bifaliny oraz peptydu 5320 ($F_{1,140} = 2,44$; $p = 0,12$) w kończynie ipsilateralnej oraz kontralateralnej ($F_{1,140} = 1,09$; $p = 0,3$), natomiast zanotowano znacznie niższe wartości

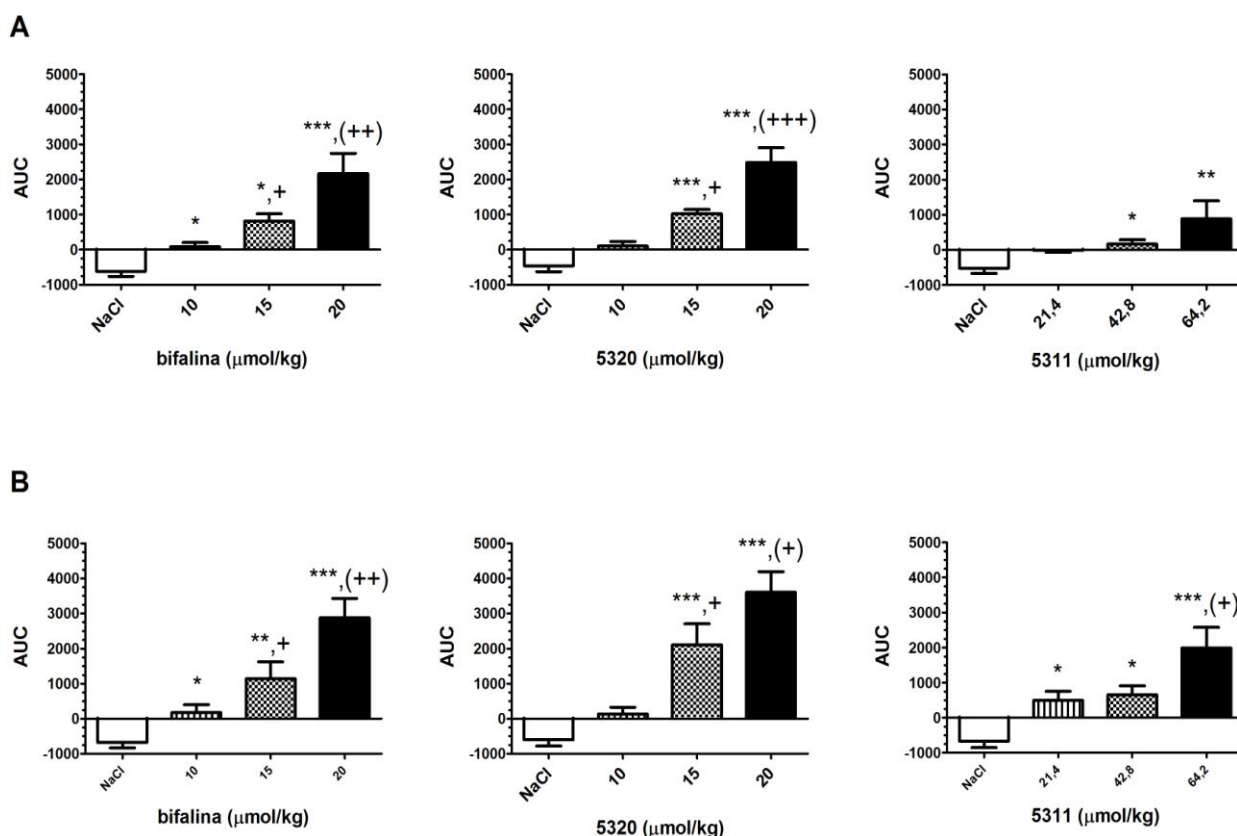
ED₅₀ dla bifaliny niż dla peptydu 5311 w kończynie ipsilateralnej ($F_{1,137} = 28,32$; $p < 0,001$) i kontralateralnej ($F_{1,137} = 30,62$; $p < 0,001$). Peptyd 5320 także wykazał niższe wartości ED₅₀ i silniejszy potencjał analgetyczny niż peptyd 5311 (kończyna ipsilateralna: $F_{1,140} = 25,21$; $p < 0,001$; kończyna kontralateralna: $F_{1,140} = 32,63$; $p < 0,001$). Dodatkowo zaobserwowano różnice w wartościach ED₅₀ pomiędzy kończynami dla bifaliny ($F_{1,140} = 6,0$; $p = 0,015$) oraz peptydu 5320 ($F_{1,140} = 10,51$; $p = 0,015$)(Ryc. 19). Bifalina oraz peptydy 5320 i 5311 wykazały większy potencjał analgetyczny w kończynie kontralateralnej niż ipsilateralnej wykazując niższe wartości ED₅₀.



Ryc. 19 Krzywe zależności efektu analgetycznego od dawki w kończynie ipsilateralnej (ipsi) i kontralateralnej (contra) po dożylnym podaniu bifaliny (A), peptydu 5320 (B) oraz peptydu 5311 (C) w tęście podszwowym ($n = 8$).

Na podstawie obliczeń powierzchni pod krzywą zależności %MPE od czasu, całkowity efekt analgetyczny w kończynie ipsilateralnej wykazywał według jednokierunkowej ANOVA dawkozależny charakter dla bifaliny ($F_{2,21} = 8,50$; $p = 0,002$) oraz peptydu 5320 ($F_{2,21} = 20,51$; $p < 0,001$)(Ryc. 20 A, B). W przypadku peptydu 5311 zwiększanie dawek nie spowodowało znaczącego wzrostu całkowitego efektu analgetycznego w kończynie ipsilateralnej ($F_{2,20} = 2,25$; $p = 0,13$). Zależność efektu od dawki potwierdzono w kończynie kontralateralnej w przypadku wszystkich analizowanych peptydów opioidowych (bifalina: $F_{2,21} = 9,60$; $p = 0,0011$; peptyd 5320: $F_{2,21} = 8,1$; $p = 0,018$; peptyd 5322: $F_{2,20} = 4,02$; $p = 0,03$).

Całkowity efekt analgetyczny obserwowany u myszy po iniekcji $10\mu\text{mol/kg}$ bifaliny wyniósł $87 \pm 119\text{j. AUC}$ w kończynie ipsilateralnej oraz 178 ± 221 w kończynie kontralateralnej i był istotnie wyższy niż w przypadku myszy kontrolnych. U myszy otrzymujących peptyd 5320 oraz peptyd 5311 pole powierzchni pod krzywą w kończynie ipsilateralnej nie różniło się od kontroli, natomiast w kończynie kontralateralnej zwierząt po podaniu $21,4\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5311 wzrosło ono do $500 \pm 259\text{j. AUC}$. Zwierzęta otrzymujące dawkę pośrednią bifaliny wykazały wartości wyższe (kończyna ipsilateralna: $\text{AUC} = 815 \pm 210\text{j.}$; kończyna kontralateralna: $\text{AUC} = 1142 \pm 481\text{j. AUC}$) niż myszy otrzymujące dawkę $10\mu\text{mol/kg}$. Całkowity efekt analgetyczny obserwowany w kończynie ipsilateralnej myszy otrzymujących $15\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5320 wyniósł $1025 \pm 123,4\text{j. AUC}$ i był istotnie wyższy niż w przypadku myszy, którym podano dawkę $10\mu\text{mol/kg}$ ($103 \pm 127\text{j. AUC}$). Podobną zależność zauważono w przypadku kończyny kontralateralnej, gdzie otrzymano wartości odpowiednio $2107 \pm 598\text{j. AUC}$ oraz $137 \pm 188\text{j. AUC}$. Zwiększenie dawki bifaliny oraz peptydu 5320 do $20\mu\text{mol/kg}$, spowodowało dalsze zwiększenie się wartości pola powierzchni pod krzywą do kolejno $2167 \pm 580\text{j. AUC}$ i $2485 \pm 424\text{j. AUC}$ w przypadku kończyny ipsilateralnej oraz $2880 \pm 553\text{j. AUC}$ i $3608 \pm 587\text{j. AUC}$ dla kończyny kontralateralnej. Kończyna kontralateralna myszy otrzymujących iniekcję $64,2\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5311 odznaczała się wystąpieniem silniejszego całkowitego efektu analgetycznego niż kończyna osobników otrzymujących dawkę $42,8\mu\text{mol/kg}$. Myszy otrzymujące najniższą dawkę peptydu 5311 wykazały natomiast porównywalne wartości AUC jak osobniki, którym podano dawkę pośrednią.



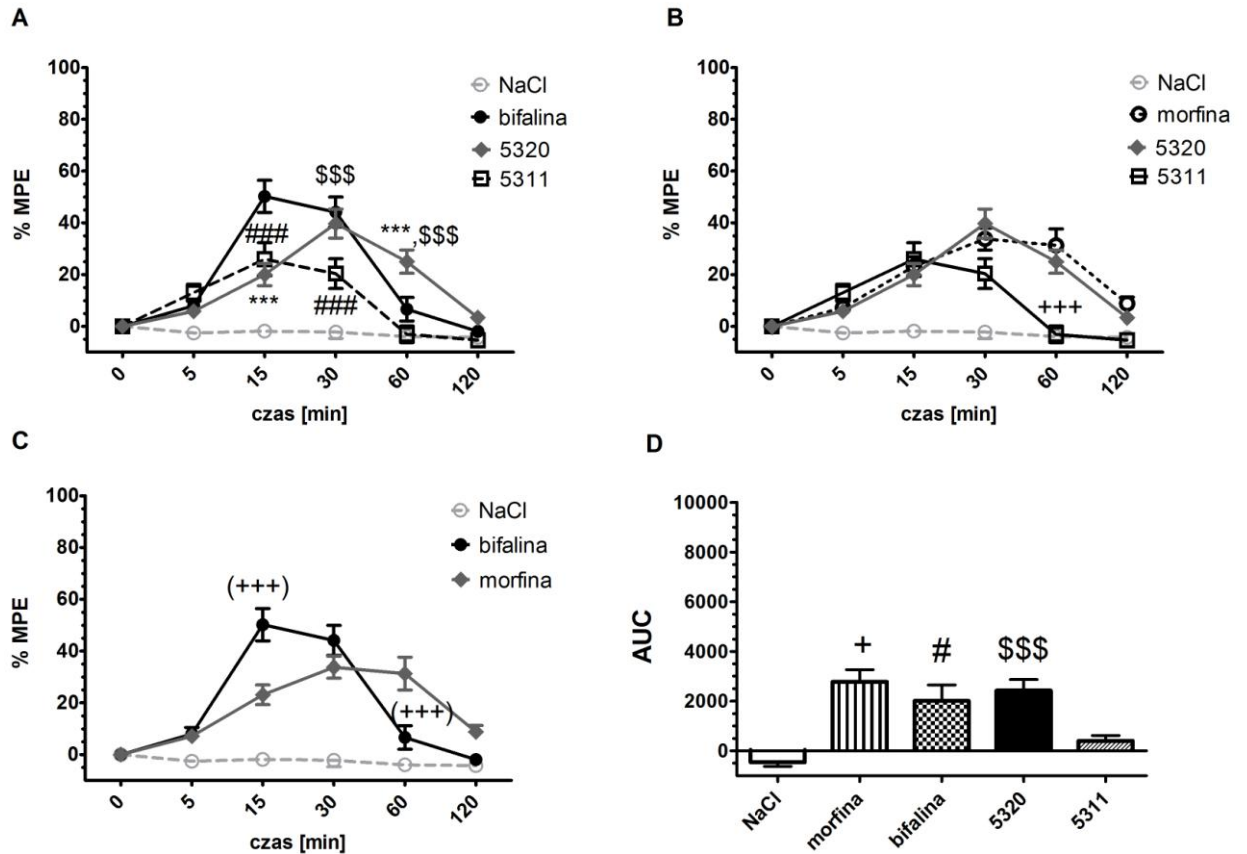
Ryc. 20. Całkowity efekt analgetyczny wyrażony jako powierzchnia pod krzywą w kończynie ipsilateralnej (panel A) i kontralateralnej (panel B) po dożylnym podaniu bifaliny, peptydu 5320 oraz peptydu 5311 mierzony w tęście podszwowych ($n = 8$). Analiza statystyczna wykonana została z użyciem jednokierunkowej ANOVA oraz testu post-hoc Newman-Keulsa. Poziom istotności statystycznej oznaczono jako: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (związek vs. NaCl); + $p < 0,05$ (dawka pośrednia vs. dawka najniższa); ++ $p < 0,01$; (+++) $p < 0,001$ (dawka najwyższa vs. dawka pośrednia).

Porównując grupy myszy otrzymujące najwyższe dawki badanych peptydów opioidowych oraz morfiny zaobserwowano różnice w odpowiedzi analgetycznej w kończynie ipsilateralnej ($F_{3,86} = 3,32$; $p < 0,05$) pomiędzy grupami oraz zmienność efektu w czasie ($F_{5,86} = 74,24$; $p < 0,001$) (Ryc. 21 A, B, C). W grupie myszy otrzymujących $20\mu\text{mol/kg}$ bifaliny odpowiedź analgetyczna w przeciwieństwie do zwierząt z grupy, której wstrzyknięto równomolową dawkę peptydu 5320 czy morfiny osiągnęła najwyższą wartość $50,2 \pm 6,2$ %MPE w 15min. doświadczenia. W tym samym punkcie pomiarowym $20\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5320 oraz $20\mu\text{mol/kg}$ morfiny spowodowało u myszy porównywalną, lecz słabszą od bifaliny odpowiedź rzędu $20,0 \pm 4,3\%$ MPE oraz

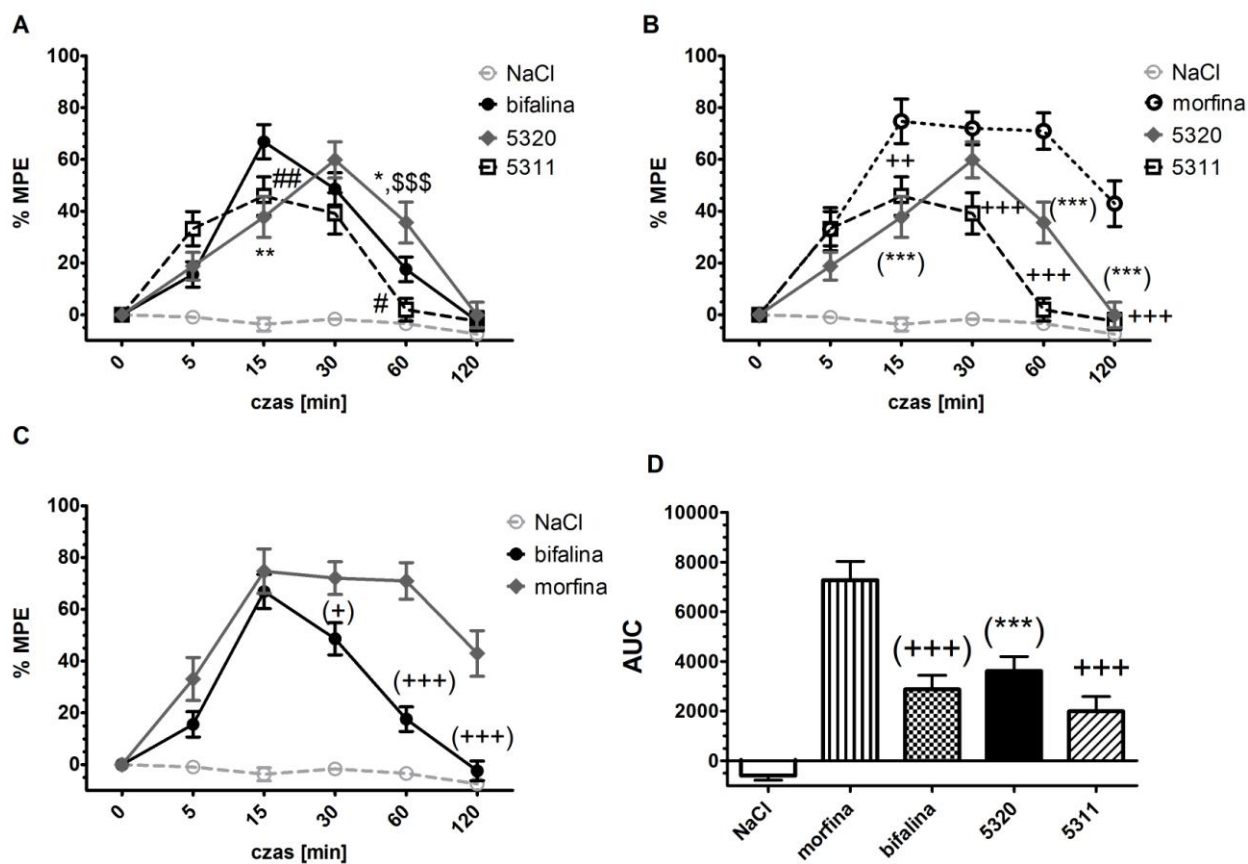
23,1 ± 4,0% MPE. Peptyd 5311 również wywołał słabszą od bifaliny oraz równoważną w odniesieniu do peptydu 5320 i morfiny analgezę sięgającą 26 ± 6,4% MPE. Dopiero w 30min. doświadczenia efekty analgetyczne bifaliny, morfiny oraz peptydu 5320 wyrównały się. Natomiast w grupie myszy otrzymujących peptyd 5311 odpowiedź był słabsza i wyniosła 20,3 ± 5,7% MPE. Po upływie godziny zwierzęta z grupy otrzymującej 5320 wykazywały podobny poziom analgezji jak zwierzęta traktowane morfiną oraz charakteryzowały się wyższymi o 18,4% wartościami %MPE od zwierząt otrzymujących bifalinę. Analgezia w grupie myszy, którym podawano peptyd 5311 zanikła a wartości %MPE nie różniły się od kontrolnych. Dwie godziny od podania związków nie obserwowano już różnic w odpowiedzi przeciwbólowej. Analiza statystyczna całkowitego efektu analgetycznego wykazała natomiast, że powierzchnie pod krzywą obliczone dla bifaliny, peptydu 5320 oraz morfiny prezentowały podobne wartości. Wykazano, iż AUC dla peptydu 5311 było znacznie niższe w porównaniu do pozostałych związków ($F_{3,26} = 7,53$; $p = 0,0009$) (Ryc. 21 D).

W kończynie kontralateralnej również zarysowały się różnice w odpowiedzi analgetycznej między grupami myszy otrzymujących bifalinę, peptyd 5320, peptyd 5311 czy morfinę ($F_{3,86} = 15,37$; $p < 0,001$). Zanotowano także różnice w czasie pojawienia się oraz czasie utrzymywania się analgezji ($F_{5,86} = 70,24$; $p < 0,001$) (Ryc. 22 A, B, C). Czas trwania oraz moment pojawienia się odpowiedzi analgetycznej między grupami myszy otrzymującymi peptydy opioidowe był podobny jak w kończynie ipsilateralnej. Widoczne różnice zarysowały się natomiast między kończynami kontralateralnymi u myszy otrzymujących morfinę w porównaniu do zwierząt otrzymujących peptydy opioidowe. Grupa otrzymująca peptyd 5320 wykazała niższe wartości %MPE w 15, 60 oraz 120min. eksperymentu niż myszy, którym wstrzyknięto ekwimolarną dawkę morfiny, podczas gdy w kończynie ipsilateralnej wartości te nie różniły się statystycznie. Podobnie u zwierząt otrzymujących peptyd 5311 zanotowano niższe wartości analgezji w porównaniu do morfiny w 15 oraz 30min. doświadczenia. Ponadto, morfina w kończynie kontralateralnej wykazała podobny efekt jak bifalina 15min. od podania oraz silniejszy efekt pół godziny po podaniu. Także analiza statystyczna całkowitego efektu analgetycznego wykazała, że powierzchnia pod krzywą

w kończynie kontralateralnej dla morfiny była znacznie większa niż dla bifaliny, peptydu 5320 oraz peptydu 5311 ($F_{3,26} = 13,25$; $p < 0,001$) (Ryc. 22 D).



Ryc. 21. Porównanie efektu analgetycznego w kończynie ipsilateralnej w zależności od czasu (A, B, C) oraz pola powierzchni pod krzywymi (D) po dożylnym podaniu $20\mu\text{mol/kg}$ bialiny, $20\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5320, $21,4\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5311 i $20\mu\text{mol/kg}$ morfiny w teście podszwawowym ($n = 8$). Analiza statystyczna wykonana została z użyciem jednokierunkowej ANOVA oraz testu post-hoc Newman-Keuls. Poziom istotności statystycznej oznaczono jako: *** $p < 0,001$ (5320 vs. bialina); # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ (5311 vs. bialina); \$\$\$ $p < 0,001$ (5320 vs. 5311); +++ $p < 0,01$ (5311 vs. morfina); (+++) $p < 0,001$ (bialina vs. morfina).



Ryc. 22. Porównanie efektu analgetycznego w kończynie kontralateralnej w zależności od czasu (A, B, C) oraz pola powierzchni pod krzywymi (D) po dożylnym podaniu 20 μmol/kg buprenorphiny, 20 μmol/kg peptydu 5320, 21,4 μmol/kg peptydu 5311 i 20 μmol/kg morfiny w teście podszwowych (n = 7-8). Analiza statystyczna wykonana została z użyciem jednokierunkowej ANOVA oraz testu post-hoc Newmana-Keulsa. Poziom istotności statystycznej oznaczono jako: *** p < 0,001 (5320 vs. buprenorphina); (***) p < 0,001 (5320 vs. morfina); # p < 0,05, ### p < 0,001 (5311 vs. buprenorphina); \$\$\$ p < 0,001 (5320 vs. 5311); +++ p < 0,01 (5311 vs. morfina); (+++) p < 0,001, (buprenorphina vs. morfina).

4.4 Działanie analgetyczne bifaliny i peptydów 5320 oraz 5311 w teście cofania ogona

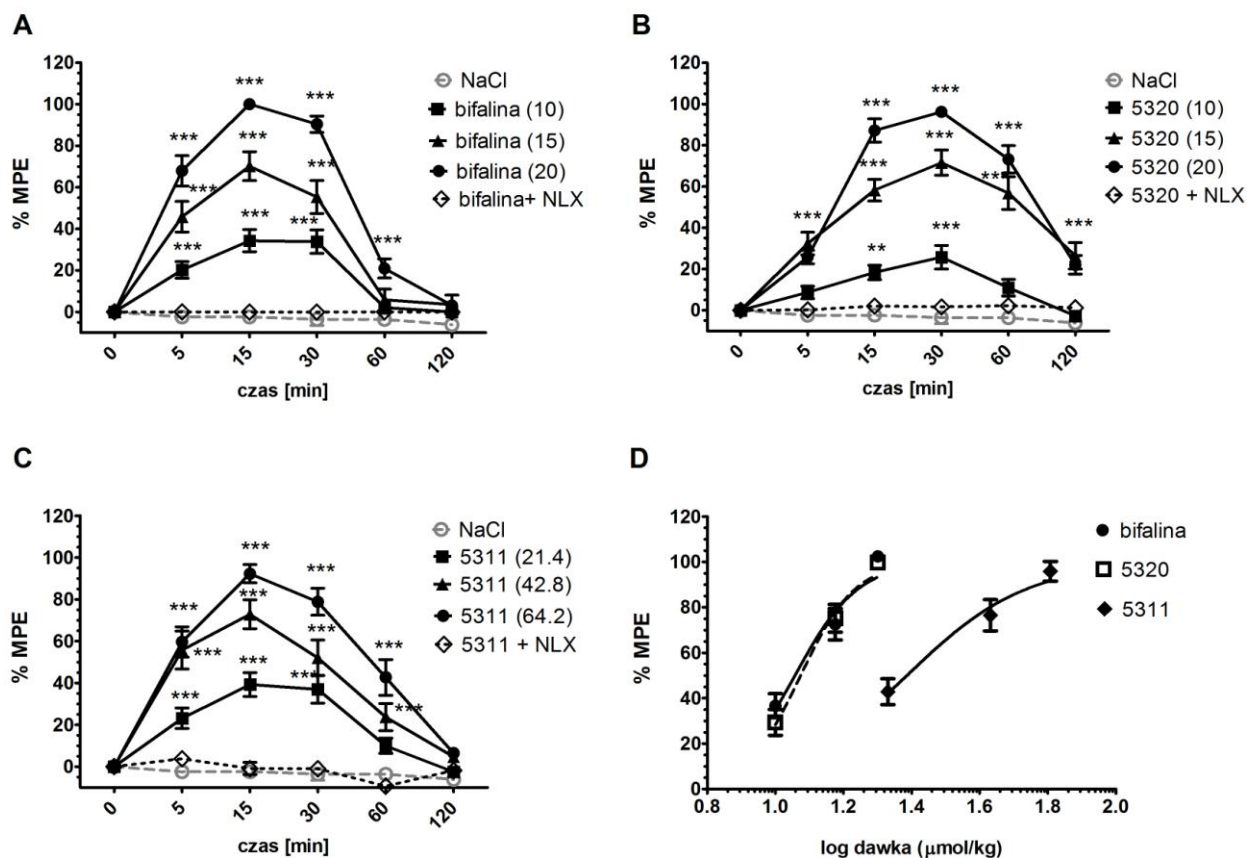
Dożylnie podanie myszom 10, 15 oraz 20 μ mol/kg bifaliny ($F_{3,92} = 67,48$; $p < 0,001$), peptydu 5320 ($F_{3,92} = 88,35$; $p < 0,001$) oraz 21,4, 42,8 i 64,2 μ mol/kg peptydu 5311 ($F_{3,89} = 59,3$; $p < 0,001$) w istotny statystycznie sposób wpłynęło na zwiększenie wartości %MPE w porównaniu do zwierząt kontrolnych (Ryc. 23 A, B, C). Efekt ten ulegał zmianom w czasie (bifalina: $F_{5,92} = 159,1$; $p < 0,001$; peptyd 5320: $F_{5,92} = 114,6$; $p < 0,001$; peptyd 5311: $F_{5,89} = 96,07$; $p < 0,001$) a maksymalny dla danej dawki efekt analgetyczny w przypadku bifaliny i peptydu 5311 obserwowano w 15min. po podaniu związku. Szczyt efektu analgetycznego w grupach otrzymujących peptyd 5320 przypadał na 30min. po iniekcji. Koiniekcja peptydów opioidowych z naltreksonem doprowadziła do spadku %MPE do poziomu kontrolnego (bifalina + NLX: $F_{1,46} = 3,90$; $p = 0,26$; peptyd 5320 + NLX: $F_{1,46} = 4,40$; $p = 0,72$; peptyd 5311: $F_{1,46} = 0,37$; $p = 0,54$).

Najniższa zastosowana dawka bifaliny (10 μ mol/kg) oraz peptydu 5311 (21,4 μ mol/kg) w przeciągu 5min. wywołała wyraźne zwiększenie się wartości %MPE o odpowiednio $36,7 \pm 5,8\%$ oraz o $25,8 \pm 5,5\%$ w porównaniu do kontroli. Kwadrans po iniekcji w grupie myszy otrzymujących bifalinę obserwowano odpowiedź analgetyczną sięgającą $33,7 \pm 5,7\%$ MPE a w grupie poddanej iniekcji peptydu 5311 wartości %MPE osiągnęły $39,3 \pm 5,7\%$. W tym samym punkcie pomiarowym zaobserwowano u myszy istotne zwiększenie się, w porównaniu do kontroli, czasu latencji w odpowiedzi na podanie 10 μ mol/kg peptydu 5320. Obserwowany efekt analgetyczny po podaniu bifaliny oraz 5311 utrzymywał się na porównywalnym poziomie do 30min. od momentu iniekcji, podczas gdy analgezja w przypadku peptydu 5320 wzrosła o $29,3 \pm 6,4\%$ MPE od poziomu kontrolnego. W godzinę po podaniu działanie przeciwbólne najniższych dawek wszystkich peptydów nie było już widoczne.

Odpowiedź analgetyczna u myszy otrzymujących 15 μ mol/kg bifaliny charakteryzowała się podobnym przebiegiem czasowym jak w przypadku osobników, którym podawano dawkę 10 μ mol/kg. Najsilniejsza odpowiedź dla tej dawki wyniosła $70,1 \pm 6,9\%$ MPE. W grupie myszy, którym podano 42,8 μ mol/kg peptydu 5311 w odróżnieniu od niższej dawki, odpowiedź przeciwbólowa wydłużyła się do godziny po

podaniu, wynosząc $23,7 \pm 6,5\%$ MPE a maksymalny osiągnięty efekt po 15min. wyniósł $72,8 \pm 6,9\%$ MPE. Iniekcja $15\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5320 spowodowała u myszy wcześniejsze pojawienie się oraz wydłużenie analgezji w czasie w porównaniu do osobników kontrolnych. Efekt analgetyczny pojawił się już 5min. po podaniu i osiągnął wartość $32,3 \pm 5,5\%$ MPE. W 30min. eksperymentu był on już o $75,1 \pm 6,7\%$ silniejszy niż u zwierząt kontrolnych. Po upływie pół godziny efekt analgetyczny osiągnął plateau, po czym zaobserwowano tendencję spadkową w 60min. od iniekcji. Po upływie 120min. od rozpoczęcia doświadczenia analgezja nadal utrzymywała się na statystycznie istotnym poziomie prezentując wyższą od kontroli wartość $26,3 \pm 6,4\%$ MPE.

Przy dawce bifaliny wynoszącej $20\mu\text{mol/kg}$ można było zaobserwować, iż efekt analgetyczny utrzymał się na poziomie wyższym od kontroli 60min. po podaniu, osiągając wartość $20,9 \pm 4,6\%$. U myszy traktowanych dawką $20\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5320 oraz $64,2\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5311 zaobserwowano podobny profil wpływu czasu na poziom odpowiedzi analgetycznej jak w przypadku dawki pośredniej. Według sporządzonych krzywych zależności odpowiedzi analgetycznej od dawki (Ryc. 23 D), wartości ED_{50} dla badanych peptydów opioidowych w teście cofania ogona przedstawiały się następująco: bifalina: $11,42 \pm 1,04\mu\text{mol/kg}$; peptyd 5320: $11,9 \pm 1,03\mu\text{mol/kg}$; peptyd 5311: $24,35 \pm 1,08\mu\text{mol/kg}$. Analiza statystyczna wykazała różnice w potencjale analgetycznym między peptydami opioidowymi ($F_{2,207} = 10,65$; $p < 0,001$). Bifalina oraz peptyd 5320 wykazywały większy potencjał analgetyczny aniżeli peptyd 5311.

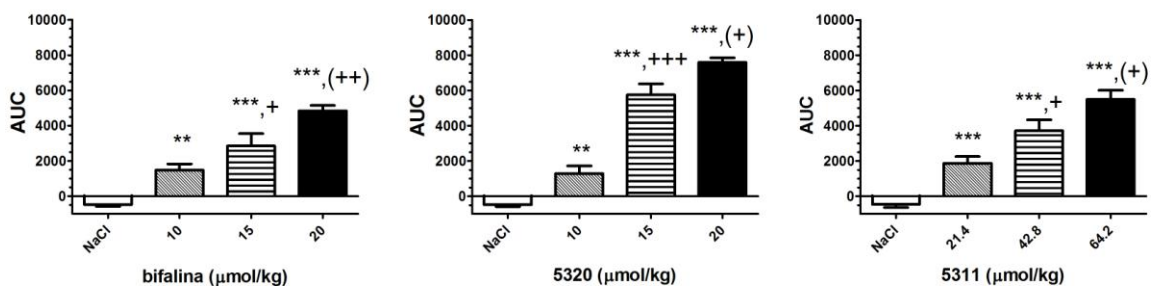


Ryc. 23. Efekt analgetyczny w zależności od czasu (A,B,C) oraz dawki (D) po dożylnym podaniu bifaliny, peptydu 5320 oraz peptydu 5311 mierzony w teście cofania ogona ($n = 8$). Dawki związków podane zostały w nawiasach w $\mu\text{mol/kg}$. Analiza statystyczna wykonana została z użyciem dwukierunkowej RM ANOVA oraz testu post-hoc Bonferroniego. Poziom istotności statystycznej oznaczono jako: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (związek vs. NaCl).

Wydłużenie się czasu reakcji bólowej na bodziec termiczny w odpowiedzi na podanie bifaliny, peptydu 5320 czy peptydu 5311 uzależnione było od dawki (bifalina: $F_{2,21} = 11,52$; $p = 0,0004$; peptyd 5320: $F_{2,21} = 48,40$; $p < 0,001$; peptyd 5311: $F_{2,20} = 13,12$; $p = 0,0002$) (Ryc. 24). Analiza statystyczna pola powierzchni pod krzywą efektu analgetycznego względem czasu wykazała, iż myszy otrzymujące $15\mu\text{mol/kg}$ bifaliny charakteryzowały się silniejszą o 93% (2852 ± 702 j. AUC vs. 1477 ± 353 j. AUC) odpowiedzią analgetyczną niż osobniki traktowane dawką $10\mu\text{mol/kg}$. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku porównania odpowiedzi analgetycznej zwierząt, którym podano dawkę $15\mu\text{mol/kg}$ i $20\mu\text{mol/kg}$. W tym przypadku pole powierzchni pod krzywą dla dawki wyższej było o 69,6% (4836 ± 308 j. AUC vs. 2852

± 702j. AUC) większe niż dla dawki 15µmol/kg. Grupa otrzymująca dawkę 15µmol/kg 5320 osiągnęła poziom całkowitego efektu analgetycznego wynoszący 5748 ± 625j. AUC, podczas gdy wartości pola pod krzywą myszy traktowanych niższą dawką sięgnęły jedynie 1288 ± 440j. AUC. Podobnie, najwyższa zastosowana dawka peptydu 5320 spowodowała wystąpienie silniejszego o 32,1% (7592 ± 258j. AUC vs. 5748 ± 625j. AUC) efektu niż w grupie myszy, którym podano 15µmol/kg peptydu 5320. Grupa zwierząt, której wstrzyknięto 42,8µmol/kg peptydu 5311 odznaczała się prawie 2-krotnie silniejszym efektem analgetycznym niż grupa otrzymująca dawkę 21,4µmol/kg (3711 ± 630j. AUC vs. 1876 ± 328j. AUC). Różnica w sile analgezji między zwierzętami otrzymującymi dawkę 64,2µmol/kg a tymi, którym podano 42,8µmol/kg peptydu 5311 wyniosła natomiast 48% (5493 ± 518j. AUC vs. 3711 ± 630j. AUC).

A

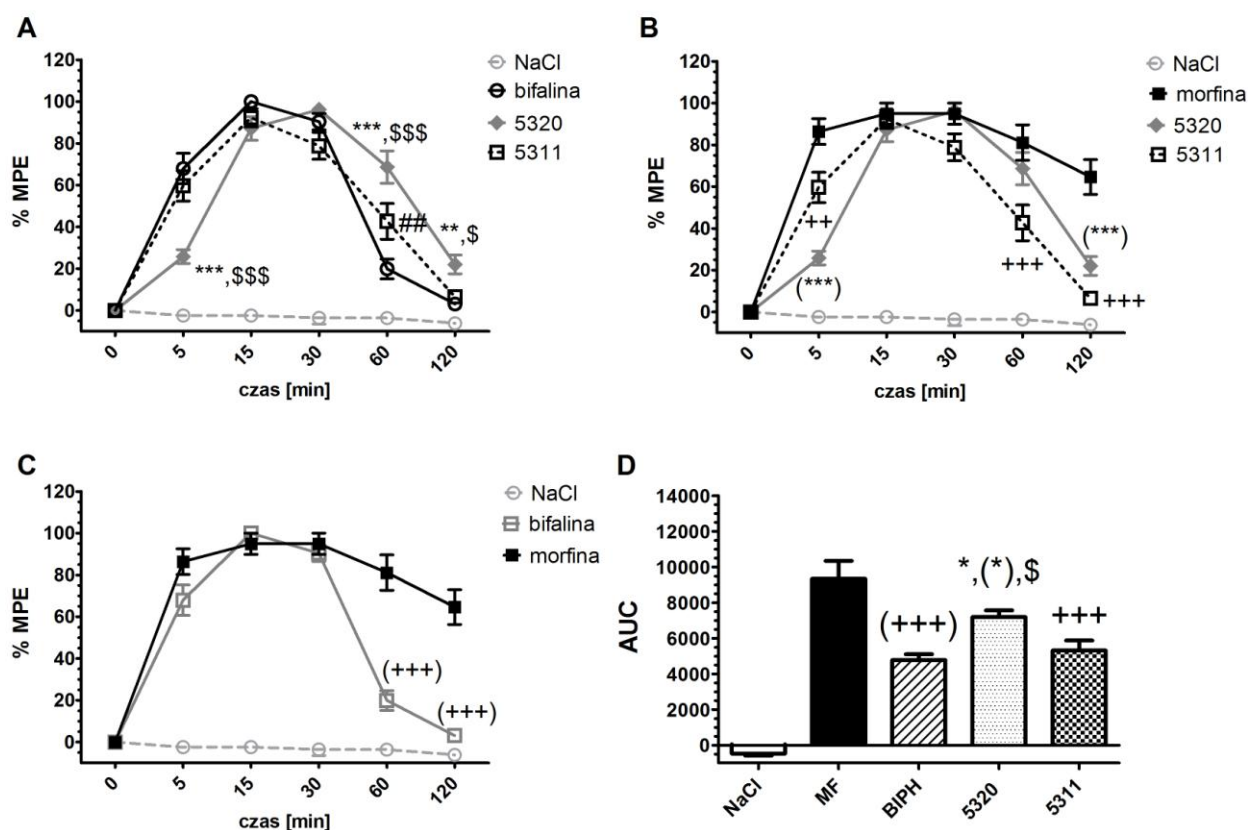


Ryc. 24. Całkowity efekt analgetyczny wyrażony jako powierzchnia pod krzywą po dożylnym podaniu bifaliny, peptydu 5320 oraz peptydu 5311 mierzony w teście cofania ogona ($n = 8$). Dawki związków podane zostały w nawiasach w µmol/kg. Analiza statystyczna wykonana została z użyciem jednokierunkowej ANOVA oraz testu post-hoc Newman-Keulsa. Poziom istotności statystycznej oznaczono jako: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (związek vs. NaCl); + $p < 0,05$; +++ $p < 0,001$ (dawka pośrednia vs. dawka najniższa); (+) $p < 0,05$; (++) $p < 0,01$; (dawka najwyższa vs. dawka pośrednia).

Porównując krzywe obrazujące poziom efektu analgetycznego względem czasu dla najwyższych dawek badanych peptydów opioidowych oraz morfiny wykazano różnice w czasie trwania oraz tempie pojawienia się odpowiedzi przeciwbólowej w teście cofania ogona ($F_{5,88} = 259,1$; $p < 0,001$) (Ryc. 25 A, B, C). W grupie zwierząt otrzymujących 20µmol/kg bifaliny oraz 64,2µmol/kg peptydu 5311 5min. po iniekcji

nastąpiła silna, porównywalna do morfiny, odpowiedź analgetyczna sięgająca odpowiednio $67,9 \pm 7,3\%$ oraz $59,6 \pm 7,3\%$ MPE. W tym czasie w grupie myszy otrzymujących $20\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5320 obserwowano słabszy poziom odpowiedzi analgetycznej rzędu kolejno $25,8 \pm 3,3\%$ MPE. Wszystkie badane związki wywołały podobny efekt analgetyczny w 15min. eksperymentu osiągając kolejno $100 \pm 0\%$ (bifalina), $87,2 \pm 5,6\%$ (peptyd 5320), $92,3 \pm 4,4\%$ (peptyd 5311) oraz $94,9 \pm 5,1\%$ MPE (morfiną). W punkcie czasowym 30min. analgezja we wszystkich grupach doświadczalnych była również porównywalna. W godzinę od iniekcji, myszy otrzymujące peptyd 5320 oraz morfinę charakteryzowały się podobnym poziomem odpowiedzi przeciwbólowej ($68,6 \pm 7,8$ oraz $81,1 \pm 8,5\%$ MPE), podczas, gdy w grupie myszy po podaniu bifaliny oraz peptydu 5311 odpowiedź ta drastycznie spadła do wartości $19,9 \pm 4,8\%$ oraz $42,6 \pm 8,6\%$ MPE. W 120min. od podania peptydu 5320 nadal można było obserwować analgezję sięgającą $22 \pm 4,5\%$ MPE, podczas gdy %MPE myszy z grupy otrzymującej bifalinę i peptyd 5311 spadł do poziomu kontrolnego. W tym punkcie czasowym u myszy z grupy morfinowej nadal obserwowano silniejszy w porównaniu do peptydów opioidowych efekt analgetyczny wynoszący $64,6 \pm 8,3\%$.

Analizując całkowity efekt analgetyczny uzyskany dla badanych peptydów opioidowych oraz morfiny zaobserwowano różnicowanie w polach powierzchni pod krzywymi ($F_{3,26} = 11,84$; $p < 0,05$) (Ryc. 25 D). Grupa myszy otrzymująca morfinę charakteryzowała się największym polem powierzchni pod krzywą wynoszącym 9340 ± 994 j. AUC w porównaniu do grup otrzymujących iniekcje peptydów opioidowych. Natomiast wśród analizowanych peptydów opioidowych peptyd 5320 odznaczał się najsilniejszym całkowitym efektem analgetycznym. Pole powierzchni pod krzywą dla grupy otrzymującej ten peptyd wyniosło 7195 ± 371 j. AUC. i było o 50% oraz o 35,4% większe w porównaniu do odpowiednio bifaliny i peptydu 5311.

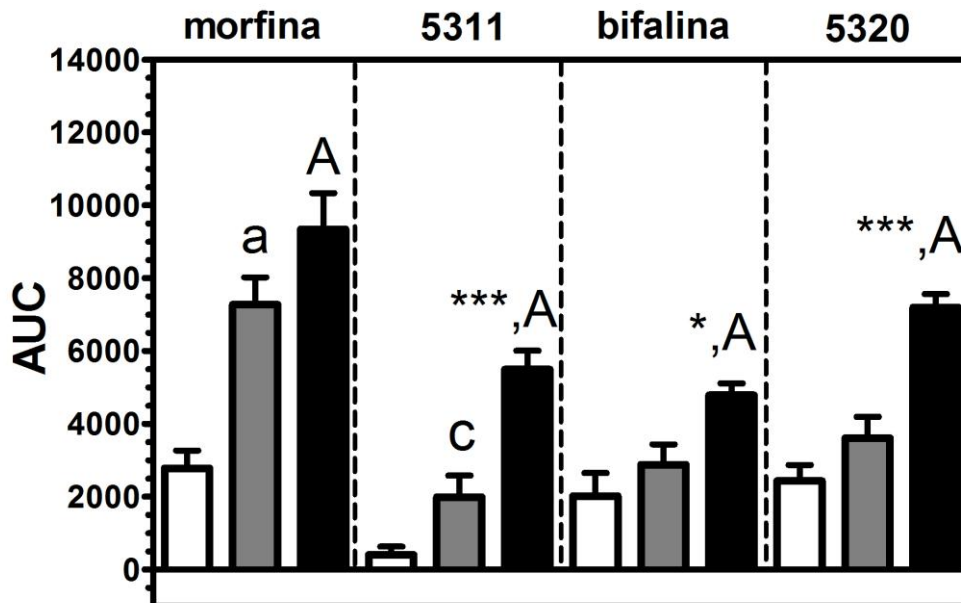


Ryc. 25. Porównanie efektu analgetycznego w zależności od czasu (A, B, C) oraz całkowitego efektu analgetycznego (D) po dożylnym podaniu 20 μ mol/kg bifaliny, 20 μ mol/kg peptydu 5320, 21,4 μ mol/kg peptydu 5311 oraz 20 μ mol/kg morfiny w teście cofania ogona ($n = 8$). Analiza statystyczna wykonana została z użyciem jednokierunkowej ANOVA oraz testu post-hoc Newmana-Keulsa. Poziom istotności statystycznej oznaczono jako: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (5320 vs. bifalina); +++ $p < 0,001$ (5311 vs. morfina); \$ $p < 0,05$, \$\$\$ $p < 0,001$, (5320 vs. 5311); (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ (5320 vs. morfina); (+++) $p < 0,001$ (bifalina vs. morfina).

4.5 Porównanie udziału analgezji ośrodkowej i obwodowej bifaliny i peptydów 5320 oraz 5311

Porównując całkowity efekt analgetyczny pomiędzy kończyną ipsilateralną, kontralateralną oraz czasem latencji w teście cofania ogona po podaniu najwyższych zastosowanych dawek związków (20 μ mol/kg bifaliny, 20 μ mol/kg peptydu 5320 oraz 64,2 μ mol/kg peptydu 5311) zaobserwowano zróżnicowanie wielkości pola powierzchni pod krzywą w zależności od zastosowanego testu ($F_{11,79} = 21,29$; $p < 0,001$) (Ryc. 26). W grupie myszy otrzymujących morfinę wartości AUC w kończynie ipsilateralnej były

2,36 - krotnie niższe w porównaniu do testu cofania ogona oraz 2,61 razy niższe niż w kończynie kontralateralnej. Całkowity efekt analgetyczny w kończynie kontralateralnej i teście cofania ogona był natomiast nieistotny statystycznie. W przypadku myszy otrzymujących iniekcję peptydu 5311 obserwowano podobną zależność. Powierzchnia pod krzywą dla kończyny ipsilateralnej była 4,9 razy mniejsza niż w kontralateralnej oraz 23-krotnie mniejsza niż w teście cofania ogona. W grupach doświadczalnych traktowanych bifaliną oraz peptydem 5320 nie odnotowano różnic w AUC pomiędzy kończynami, natomiast była różnica w całkowitym efekcie analgetycznym w porównaniu do testu cofania ogona. Myszy, którym podano bifalinę odznaczały się 2,4-krotnie silniejszą odpowiedzią w teście cofania ogona niż w teście podszwowy podczas stymulacji kończyny ipsilateralnej. W przypadku kończyny kontralateralnej efekt w niej osiągnięty był 1,6-krotnie niższy niż w teście cofania ogona. Podanie peptydu 5320 spowodowało natomiast 2,95 - krotnie oraz dwukrotnie silniejszą odpowiedź w teście cofania ogona niż w kolejno kończynie ipsilateralnej i kontralateralnej.

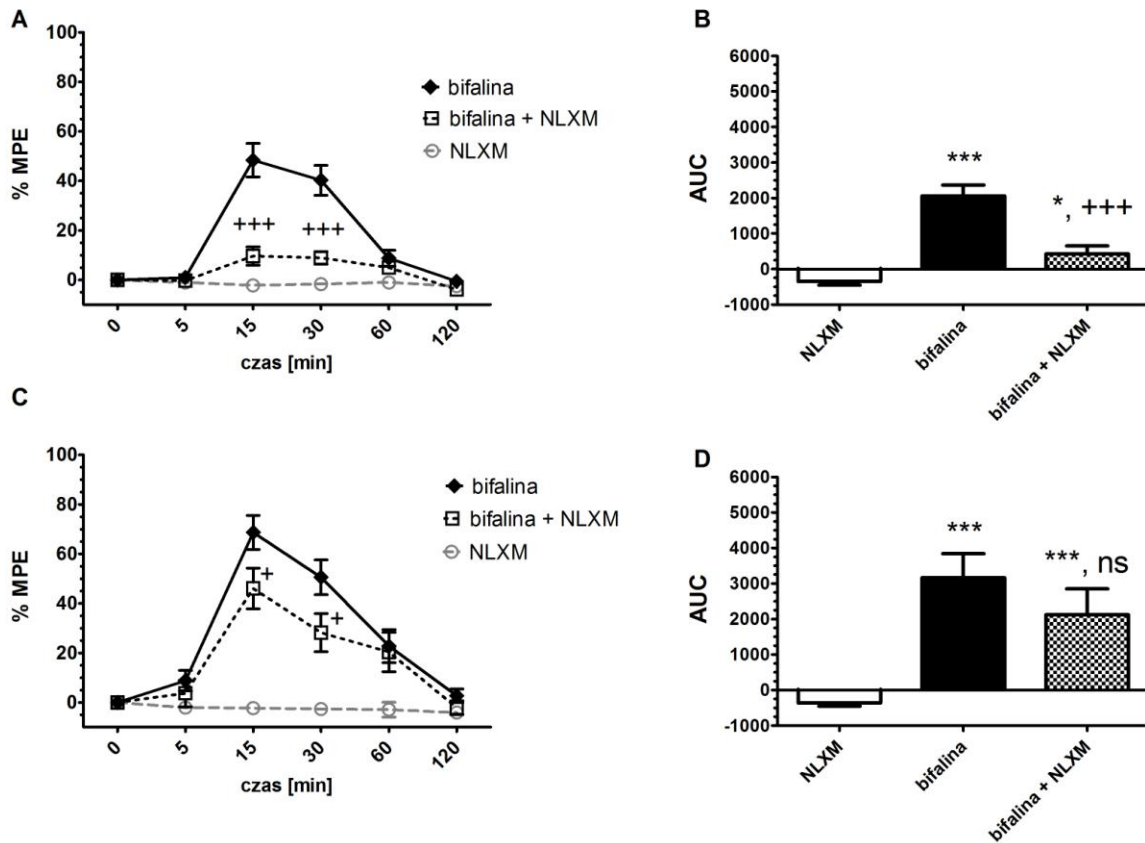


Ryc. 26. Porównanie całkowitego efektu analgetycznego między kończynami ipsilateralną-„ipsi” (słupki białe) kontralateralną-„contra” (słupki szare) oraz w teście cofania ogona- „ogon” (słupki czarne) po dożylnym podaniu $20\mu\text{mol/kg}$ morfiny, $64,2\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5311, $20\mu\text{mol/kg}$ bifaliny oraz $20\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5320 ($n = 8$). Analiza statystyczna wykonana została z użyciem jednokierunkowej ANOVA oraz testu post-hoc Newman-Keulsa. Poziom istotności statystycznej oznaczono jako: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (ogon vs. contra); c $p < 0,05$, a $p < 0,001$ (ipsi vs. contra); A $p < 0,001$ (ogon vs. ipsi).

Udział obwodowego efektu analgetycznego dla bifaliny w teście podszwowy i teście cofania ogona potwierdzony został po podaniu $21,3\mu\text{mol/kg}$ nieprzenikającego przez BBB metylojodku naloksonu (NLXM). U myszy otrzymujących iniekcję NLXM 5min. przed podaniem $20\mu\text{mol/kg}$ bifaliny zaobserwowano znaczne obniżenie się wartości %MPE w kończynie ipsilateralnej z $48,4 \pm 6,7\%$ do $9,6 \pm 3,7\%$ w 15min. doświadczenia ($F_{1,46} = 28,8$; $p < 0,001$) (Ryc. 27 A).

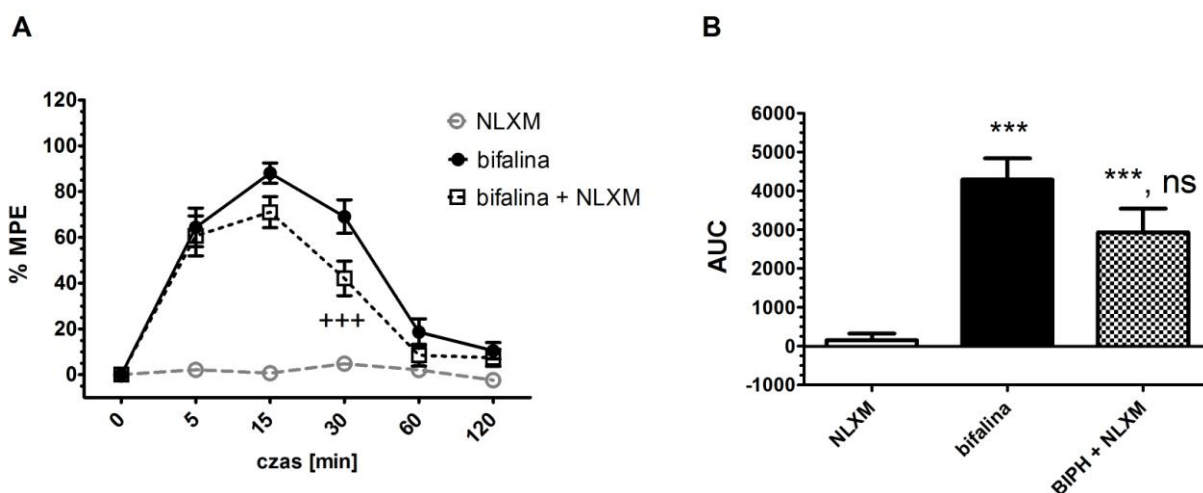
Podobnie, całkowity efekt analgetyczny uległ statystycznie istotnemu obniżeniu z 2061 ± 304 do 427 ± 222 j. AUC, lecz wartości pola powierzchni pod krzywą nadal pozostawały wyższe od kontroli ($p = 0,0007$) (Ryc. 27 B) (Tab. 4). W przypadku kończyny kontralateralnej zaobserwowano co prawda statystycznie istotne obniżenie efektu analgetycznego z $68,7 \pm 6,9\%$ do $46 \pm 8,2\%$ MPE w 15min. doświadczenia ($F_{1,46} = 4,3$; $p < 0,05$) (Ryc. 27 C), jednakże całkowity efekt analgetyczny nie uległ zmianie ($p = 0,31$)(Ryc. 27 D). Myszy otrzymujące tylko bifalinę osiągnęły całkowitą wartość efektu

analgetycznego na poziomie 3171 ± 674 j. AUC, natomiast osobniki otrzymujące koiniekcję NLXM i bifaliny uzyskały średnią wartość równą 2126 ± 726 j. AUC.



Ryc. 27. Wpływ dootrzewnowej iniekcji $21,3\mu\text{mol/kg}$ metylojodku naloksonu (NLXM) na efekt analgetyczny w kończynie ipsilateralnej (A,B) oraz kontralateralnej (C,D) po dożylnym podaniu $20\mu\text{mol/kg}$ bifaliny w teście podszwowy (n = 8). Analiza statystyczna wykonana została z użyciem jednokierunkowej ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keulsa (A,C) oraz testu t-Studenta (B, D). Poziom istotności statystycznej oznaczono jako: *** p < 0,001 (vs. NLXM); + p < 0,05, +++ p < 0,001, ns - brak istotności statystycznej (bifalina vs. bifalina + NLXM).

W teście cofania ogona odpowiedź analgetyczna różniła się pomiędzy grupą myszy otrzymujących bifalinę oraz grupą otrzymującą koiniekcję bifaliny i NLXM tylko pół godziny od podania ($F_{1,46} = 4,5$; p < 0,05) (Ryc. 28 A). Porównując pola powierzchni pod krzywymi przy zastosowaniu testu t-Studenta nie wykazano natomiast różnic pomiędzy tymi dwiema grupami myszy (p = 0,12). Różnice zarysowały się jedynie w porównaniu do zwierząt kontrolnych otrzymujących NLXM ($F_{2,21} = 18,79$; p < 0,001) (Ryc. 28 B).



Ryc. 28. Wpływ dootrzewnowej iniekcji 21,3 μ mol/kg metylojodku naloksonu (NLXM) na efekt analgetyczny wzgl. czasu (A) oraz całkowity efekt analgetyczny (B) po dożylnym podaniu 20 μ mol/kg bialiny w teście cofania ogona ($n = 8$). Analiza statystyczna wykonana została z użyciem jednokierunkowej ANOVA wraz z testem post-hoc Newmana-Keulsa (A) oraz testu *t*-Studenta (B). Poziom istotności statystycznej oznaczono jako: *** $p < 0,001$ (vs. NLXM); +++ $p < 0,001$, ns - brak istotności statystycznej (bialina vs. bialina + NLXM).

Tabela 4. Wartości całkowitego efektu analgetycznego po podaniu bialiny, bialiny wraz z NLXM oraz NLXM.

związek	Całkowity efekt analgetyczny (AUC \pm SE, j.AUC)		
	test podeszwowy - kończyna ipsilateralna	test podeszwowy - kończyna kontralateralna	test cofania ogona
bialina	2061 \pm 303,8 ***	3171 \pm 674,1 ***	4292 \pm 550,2 ***
bialina + NLXM	427,5 \pm 221,9 *, +++	2126 \pm 726,1 ***, ns	2932 \pm 615,6 ***, ns
NLXM	-349,7 \pm 104,7	-361,4 \pm 64,61	153,7 \pm 168,9

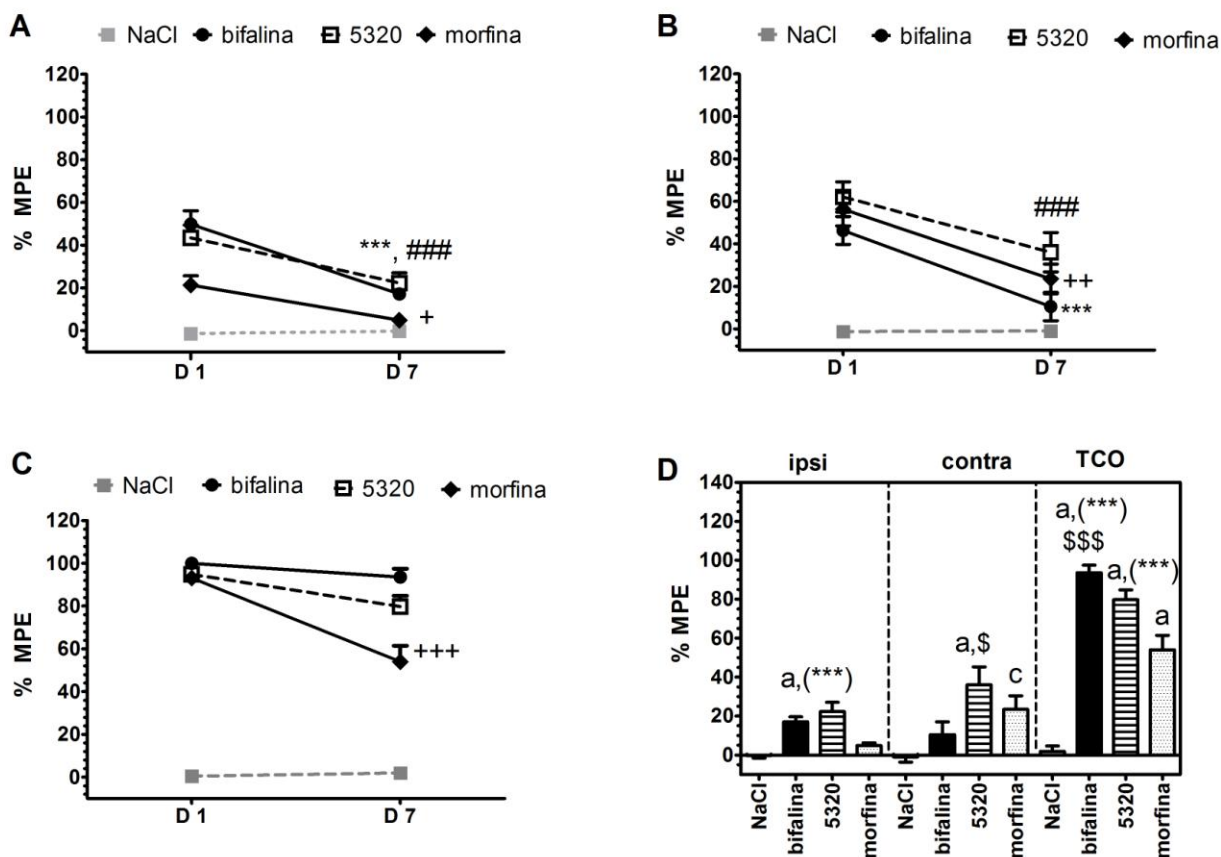
*** $p < 0,001$ (vs. NLXM), +++ $p < 0,001$, ns - brak istotności statystycznej (bialina vs. bialina + NLXM) - jednokierunkowa ANOVA, test post-hoc Newmana-Keulsa.

4.6 Rozwój tolerancji na bialinę, peptyd 5320 oraz morfinę

W doświadczeniu ciągłego, dożylnego podawania 20 μ mol/kg bialiny, 20 μ mol/kg peptydu 5320 oraz dootrzewnowych iniekcji 42,8 μ mol/kg morfiny przez siedem dni

wykazano istotny wpływ czasu na zmianę poziomu efektu analgetycznego w teście podszwowy zarówno w kończynie ipsilateralnej ($F_{1,92} = 33,65$; $p < 0,001$), kontralateralnej ($F_{1,92} = 26,98$; $p < 0,001$) oraz teście cofania ogona ($F_{1,92} = 23,42$; $p < 0,001$) (Ryc. 29) (Tab. 5). W przypadku wszystkich analizowanych związków zaobserwowano istotne statystycznie osłabienie odpowiedzi analgetycznej po siedmiu dniach podawania w porównaniu do dnia pierwszego w teście podszwowy. W grupie myszy otrzymujących bifalinę zanotowano po siedmiu dniach 66% spadek wartości %MPE w kończynie ipsilateralnej oraz 77% spadek %MPE w kończynie kontralateralnej. W przypadku zwierząt, którym podawano peptyd 5320 oraz morfinę odpowiedź analgetyczna kończyny ipsilateralnej osłabiła się o odpowiednio 48,6% oraz 77% w porównaniu z dniem pierwszym. Reakcja na termiczny bodziec bólowy wzrosła się dla obu tych związków: o 42% w przypadku peptydu 5320 oraz o 58% dla morfiny (Ryc. 29 A, B). W teście cofania ogona w grupach myszy poddanych przewlekłemu podawaniu bifaliny oraz peptydu 5320 nie odnotowano spadku wartości %MPE w przeciwieństwie do zwierząt otrzymujących morfinę, które odznaczały się analgezą słabszą o 42% w odniesieniu do pierwszego dnia doświadczenia (Ryc. 29 C).

W siódmym dniu podawania badanych związków zaobserwowano pomiędzy nimi różnice w wywołanym efekcie analgetycznym a także różnice w porównaniu do kontroli w kończynie ipsilateralnej (ipsi) ($F_{3,92} = 13,48$; $p < 0,001$), kontralateralnej (contra) ($F_{3,92} = 5,54$; $p = 0,0015$) oraz teście cofania ogona ($F_{3,92} = 63,05$; $p < 0,001$) (Ryc. 29 D). W kończynie implantowanej komórkami czerniaka zarówno w grupach myszy otrzymujących iniekcje bifaliny i peptydu 5320 wartości %MPE były istotnie wyższe od kontroli i wyniosły kolejno $17,1 \pm 2,6\%$ oraz $22,3 \pm 4,7\%$. U zwierząt traktowanych morfiną nie zauważono natomiast istotnego statystycznie efektu analgetycznego. W kończynie kontralateralnej peptyd 5320 oraz morfina w odróżnieniu od bifaliny zachowały swoją aktywność przeciwbólową prezentując wartości wynoszące $36,0 \pm 9,2\%$ oraz $23,5 \pm 7,0\%$ MPE. W teście cofania ogona efekt analgetyczny utrzymał się w przypadku wszystkich badanych związków z tym, że analgeza wywołana przez bifalinę była istotnie silniejsza od odpowiedzi uzyskanej dla peptydu 5320 (o 13,8% MPE) oraz morfiny (o 39,5 %MPE).



Ryc. 29. Efekt analgetyczny w dniu pierwszym (D1) i dniu siódmym (D7) od dożylnego podania $20\mu\text{mol/kg}$ bifaliny, $20\mu\text{mol/kg}$ peptydu 5320 oraz dootrzewnowego podania $42,8\mu\text{mol/kg}$ morfiny w kończynie ipsilateralnej (A), kontralateralnej (B) i teście cofania ogona (C) oraz efekt analgetyczny w dniu siódmym (D). Analiza statystyczna wykonana została z użyciem dwukierunkowej RM ANOVA wraz z testem post-hoc Bonferroniego (A,B,C) oraz jednokierunkowej ANOVA oraz testem post-hoc Newman-Keulsa (D). Poziom istotności statystycznej przedstawiony został następująco: *** $p < 0,001$, (bifalina D1 vs. bifalina D7), ### $p < 0,001$ (5320 D1 vs. 5320 D7), + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ (morfina D1 vs. morfina D7); c $p < 0,05$, a $p < 0,001$ (vs. NaCl); (***) $p < 0,001$ (vs. morfina); \$ $p < 0,05$, \$\$\$ $p < 0,001$ (bifalina vs. 5320).

Tabela 5. Wartości efektu analgetycznego bifaliny, analogu 5320 oraz morfiny w doświadczeniu przewlekłym

związek	Efekt analgetyczny (MPE ± SE, %) w czasie po iniekcji [dzień]					
	test podaszowy - kończyna ipsilateralna (ipsi)		test podaszowy - kończyna kontralateralna (contra)		test cofania ogona (TCO)	
	dzień 1	dzień 7	dzień 1	dzień 7	dzień 1	dzień 7
bifalina	49,9 ± 6,2	17,1 ± 2,6 *** , a, (***)	46,3 ± 6,7	10,5 ± 6,6 ***	100 ± 0,0	93,6 ± 3,9 a, (***) , \$\$\$
5320	43,4 ± 5,9	22,3 ± 4,7 ###, a, (***)	62,1 ± 7,1	36,0 ± 9,2 ###, a, (*)	94,9 ± 2,5	79,7 ± 5,1 a, (***)
morfina	21,3 ± 4,3	4,9 ± 1,4 +	56,3 ± 7,8	23,5 ± 7,0 ++, c	93,2 ± 2,6	54,0 ± 7,4 +++, a
NaCl	-1,39 ± 2,6	-0,3 ± 1,2	-1,3 ± 2,3	-0,99 ± 2,6	0,5 ± 1,6	1,9 ± 2,8

*** $p < 0,001$, (bifalina D1 vs. bifalina D7); ### $p < 0,001$ (5320 D1 vs. 5320 D7)

+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ (morfina D1 vs. morfina D7)

(*) $p < 0,05$ (5320 vs. bifalina)

c $p < 0,05$, a $p < 0,001$ (vs. NaCl)

(***) $p < 0,001$ (vs. morfina)

\$\$\$ $p < 0,001$ (bifalina vs. 5320)

} dwukierunkowa RM ANOVA, test post-hoc Bonferroniego

} jednokierunkowa ANOVA, test post-hoc Newman-Keulsa

5. DYSKUSJA

Czerniak złośliwy (łac - *melanoma malignum*) jest nowotworem skóry o wysokim stopniu złośliwości charakteryzującym się wysokim wskaźnikiem śmiertelności. Co więcej, od kilkudziesięciu lat obserwuje się dynamiczny wzrost zachorowalności na ten typ nowotworu (Wronkowski i wsp. 2005; Godar i wsp. 2011). Postęp choroby nowotworowej bardzo często związany jest z rozwojem chronicznych bólów, często narastających aż do śmierci. Pomimo, iż ból nie jest głównym objawem towarzyszącym rozwojowi pierwotnego ogniska czerniaka złośliwego, ok. 7% pacjentów jednak go doświadcza (Negin i wsp. 2003). Objawy bólowe u pacjentów pojawiają się najczęściej z powodu przerzutów do węzłów chłonnych, płuc, wątroby, kości oraz mózgu i wymagają w ponad połowie przypadków paliatywnego leczenia przeciwbólowego (Lehembre i wsp. 2006; Leach i wsp. 2008). Nieprzerwane starania nad opracowaniem nowych, skuteczniejszych leków przeciwnowotworowych doprowadziły do znacznego wydłużenia się życia pacjentów dotkniętych problemem choroby nowotworowej. Jednakże walka z nowotworem pociąga za sobą również potrzebę przewlekłego stosowania leków przeciwbólowych, których skuteczność rzutuje również na efektywność terapii przeciwnowotworowej. Dostępne farmakologiczne środki przeciwbólowe, skuteczne w bólu ostrym, w stosowaniu przewlekłym wykazują ograniczoną przydatność. U pacjentów borykających się z bólem pochodzenia onkologicznego stosunkowo szybko pojawia się tolerancja na przewlekle stosowane leki, co powoduje konieczność ciągłego zwiększania dawek. Inne działania niepożądane analgetyków, w tym zaparcia, sedacja, depresja oddechowa, powodują konieczność limitowania dawek leków lub zmiany leku na inny. Pomimo stosowania wytycznych „drabiny analgetycznej” WHO nadal ponad 30% pacjentów deklaruje niedostateczne działania przeciwbólowe (Fisch i wsp. 2012). U ok. 10-20% terminalnie chorych występujący ból jest zasadniczym problemem i przyczyną prośby o eutanazję. Dlatego też opracowanie nowych środków przeciwbólowych w terapii bólów przewlekłych, w tym nowotworowych, oraz metod ich podawania staje się jednym z największych wyzwań chemii medycznej i farmakologii.

W celu przetestowania nowych związków przeciwbólowych konieczne jest zastosowanie odpowiedniego modelu zwierzęcego. W ostatniej dekadzie

wprowadzono kilka mysich modeli bólu nowotworowego, wywołanego podskórnym wszczepieniem komórek czerniaka w podszewę tylnej kończyny. Modele te dobrze obrazują objawy bólowe występujące u chorych takie jak termiczna hiperalgezia i allodynia oraz dają możliwość rzetelnego ich pomiaru w testach behawioralnych (Constantin i wsp. 2008; Gao i wsp. 2009). Przedstawiony w niniejszej pracy zwierzęcy model badawczy polegał na podskórnej implantacji komórek czerniaka linii B16F0 w spodnią stronę śródstopia myszy. U zwierząt wystąpiły objawy bólowe manifestujące się przeculicą na bodziec termiczny, ograniczone tylko do kończyny implantowanej komórkami nowotworowymi. Obserwacja ta zgodna jest z wynikami innych grup badawczych. W podobnym modelu opisywanym przez Sasamura i wsp. (2002) obserwowana hiperalgezia miała charakter dwufazowy. Pierwsza faza przypadła na 8 dzień od implantacji komórek czerniaka linii B16-BL6 a obniżenie progu bólowego związane było z wystąpieniem procesu zapalnego. Drugą fazę, pojawiającą się 16 dni po implantacji, charakteryzowała natomiast komponenta neuropatyczna. W zastosowanym w doświadczeniach modelu również zaobserwowano dwufazowość nasilania się objawów bólowych, jednak była ona mniej zaznaczona. Pierwsza faza, w której zaobserwowano obniżenie się czasu latencji kończyny ipsilateralnej, wystąpiła dopiero w dniu 16 od implantacji komórek o czasie trwania równym 24 godziny. W następnym dniu nastąpiło kolejne, wyraźnie obniżenie się progu bólowego. Późniejsze wystąpienie zjawiska termicznej hiperalgezji w badanym modelu może być skorelowane z niższym potencjałem inwazyjnym linii komórkowej B16F0 w porównaniu do linii B16-BL6 (Zhao i wsp. 2001).

Powszechnym podejściem w opracowywaniu nowych związków przeciwbólowych jest synteza analogów charakteryzujących się wysokim potencjałem analgetycznym, stabilnością oraz selektywnością w stosunku do jednego typu receptora. Inne podejście zakłada syntezę dimerycznych związków oddziałujących na szersze spektrum receptorów biorących udział w określonym efekcie biologicznym. Uzyskany efekt nie jest więc jedynie sumą interakcji farmakoforów z określonymi receptorami ale działaniem synergistycznym. W przypadku dimerycznych, pochodnych endogennych enkefalin takich jak bifalina, interakcja z dwoma typami receptorów opioidowych daje efekt synergistyczny, gdyż rozdzielenie farmakoforów zmniejsza wiązanie do

receptorów δ ok. 100-krotnie przy niezmiennym powinowactwie do receptora μ (Lipkowski i wsp. 1999).

Naturalne peptydy opioidowe posiadają jednak pewne wady utrudniające ich bezpośrednie zastosowanie w farmakologii klinicznej. Imponujący efekt analgetyczny osiągnąć jest niestety tylko po podaniu dokomorowym bądź intratekalnym, gdyż endogenne peptydy ulegają szybkiej degradacji po podaniu systemowym. Tetrapeptydowy motyw Try-Gly-Gly-Phe na N-końcu jest bowiem rozpoznawany przez aminopeptydazy oraz enkefalinazy. Synteza biologicznie aktywnych peptydomimetyków polega na zachowaniu unikalnej sekwencji N-końcowej odpowiedzialnej za efekt analgetyczny przy jednoczesnym wprowadzaniu zmian chroniących cząsteczkę przed degradacją. Główne modyfikacje polegają na wstawieniu nienaturalnych aminokwasów do ich łańcucha np. D-aminokwasów; projektowaniu peptydów dimerycznych, wiążących się z dwoma receptorami jednocześnie, a także indukcji zmian konformacyjnych lub modyfikacji wiązań chemicznych (Schiller 1991, 1993). Zastąpienie aminokwasów naturalnych bądź wstawienie D-aminokwasów w sekwencję peptydową, szczególnie w pozycji 2, prowadzi do zwiększenia odporności peptydu na enzymatyczną degradację w ustroju. Ponadto wymuszają one zmiany konformacyjne, co prowadzi często do zwiększenia specyficzności oraz powinowactwa do receptora. Dlatego w badaniach w niniejszej pracy przeanalizowano trzy analogi enkefalin, wykazujące różne modyfikacje strukturalne: bifalinę o strukturze dimerycznej, łączącej dwa farmakofory enkefalinopodobne połączone "głowa do głowy" mostkiem hydrazydowym; analog bifaliny 5320 z substytucją [D-Thr] w pozycji 2 i 2'; analog bifaliny 5311 posiadający mostek karbonylodihydazydowy zamiast mostka hydrazydowego. Jak wykazały badania radioizotopowe, bifalina wykazała się najwyższymi wartościami powinowactwa w stosunku do receptorów opioidowych μ oraz δ spośród wszystkich analizowanych związków. Zamiana [D-Ala²] na [D-Thr²] nieznacznie obniżyła powinowactwo jej analogu 5320 do receptora typu μ oraz δ a modyfikacja mostka hydazydowego w strukturze peptydu 5311 spowodowała nieznaczne obniżenie powinowactwa analogu 5311 tylko do receptora typu μ . Zjawisko zmniejszenia się powinowactwa do receptorów μ i δ w wyniku podstawienia większego aminokwasu w miejsce [D-Ala²] sekwencji peptydowej potwierdzają doniesienia

literaturowe (Mosberg 1987). W przypadku analogów enkefalinowych opisywanych w literaturze podstawienie [D-Ala²] innymi aminokwasami, takimi jak [D-Leu²] czy [D-Phe²], spowodowało drastyczny spadek powinowactwa w badaniach radioizotopowych (Coy i wsp. 1976). Pomimo obniżenia się powinowactwa analogów bifaliny wskutek modyfikacji strukturalnych, ich wartości IC₅₀ pozostały nadal w przedziale nanomolowym. Można więc przypuszczać, że podstawienie w strukturze peptydu 5320 [D-Ala²] [D-Thr²] oraz modyfikacja łącznika hydrazydowego w strukturze peptydu 5311 nie wpływają znacząco na ich powinowactwo receptorowe. Oba analogi bifaliny wykazywały natomiast silniejsze powinowactwo do receptorów δ niż morfina a peptyd 5311 charakteryzował się również niewiele wyższym powinowactwem do receptora μ. Funkcjonalne badania radioreceptorowe wykazały, iż bifalina najefektywniej spośród wszystkich badanych związków aktywowała wewnątrzkomórkowy system przekazywania angażujący białka G. Pomimo różniących się wartości powinowactwa receptorowego w stosunku do receptorów μ i δ pomiędzy peptydem 5320 oraz peptydem 5311 oba te związki wykazały się porównywalną efektywnością w badaniach funkcjonalnych. Wykazały się w tym względzie jeszcze wyższą efektywnością niż specyficzny, pełny agonista receptora μ - DAMGO aniżeli agonista częściowy, jakim jest morfina. Brak korelacji pomiędzy wartościami powinowactwa a efektywnością stymulacji wewnątrzkomórkowych szlaków transdukcji sygnału wynika z faktu, iż kompetycyjne badania receptorowe określają jedynie interakcję ligand-receptor bez względu na to, czy receptor znajduje się w formie aktywnej czy nieaktywnej. Dlatego też różnice w wartości powinowactwa związków nie muszą korelować z różnicami w efektywności. Morfina, mimo niższej efektywności, charakteryzowała się natomiast niższymi wartościami potencjału analgetycznego i przy niższych dawkach niż badane peptydy opioidowe wywoływała 50% stymulację aktywności białek G.

Korzystniejsze w porównaniu do morfiny parametry powinowactwa oraz zdolności aktywowania wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych przez peptydy opioidowe mogą być wynikiem ich unikalnej budowy. Po pierwsze, obecność dwóch farmakoforów sprzyja wiązaniu się do dwóch centrów aktywnych receptorów jednocześnie. Hydroliza jednego z farmakoforów nie czyni cząsteczki nieaktywną, gdyż drugi farmakofor nadal może wiązać się z receptorem (Lipkowski 1987). Po drugie,

struktura farmakoforów jest na tyle giętka, że łatwiej dopasowują się do miejsca wiązania liganda w receptorach, co sprzyja stabilizacji aktywnej konformacji pozwalającej na interakcję z białkiem G. Częściowi agoniści tacy jak morfina, również promują przyjęcie przez receptor odpowiedniej konformacji, jednakże liczba aktywowanych w ten sposób receptorów jest znacznie mniejsza (Traynor i wsp. 2002). Po trzecie, bifalina wykazuje wyższe niż morfina powinowactwo w stosunku do wszystkich typów receptorów opioidowych, co sprzyja efektowi synergistycznemu (Lipkowski i wsp. 1987).

Obiecujące wyniki uzyskane w badaniach radioizotopowych skłoniły do analizy właściwości przeciwbólowych analizowanych peptydów opioidowych *in vivo* oraz poprzez ocenę ich przydatności w terapii bólu nowotworowego. Właściwości analgetyczne wszystkich związków zbadane zostały w dwóch testach behawioralnych obrazujących odmienny typ analgezji, angażujący receptory z różnych obszarów (mózg, rdzeń kręgowy, obwodowe zakończenia czuciowe). Test cofania ogona od czasu jego opisanie przez D'Amour'a i Smith'a w 1941r. jest szeroko stosowany w zwierzęcych modelach nocyciepcji. Cofnięcie ogona wskutek zadziałania termicznego bodźca uszkodzającego jest generalnie uważany za odruch rdzeniowy (Irwin i wsp. 1951). Odruch ten może być jednak modulowany przez hamujące bądź pobudzające oddziaływanie struktur nadrdzeniowych takich jak NRM czy PAG na neurony wstawkowe, ponieważ przykładowo pobudzenie PAG przez podanie mikroiniekcji morfiny powoduje wydłużenie czasu latencji w teście cofania ogona (Mayer i wsp. 1971). Mechanizm ten zyskuje na znaczeniu w przypadku czasu latencji w teście cofania ogona ok. 4-5s. (Jensen i Yaksh 1986). W przedstawionych w pracy doświadczeniach czas latencji w teście cofania ogona wyniósł średnio 3s, dlatego można twierdzić, że obserwowana analgezja jest związana z preferencyjną modulacją nocyciepcji przez badane związki opioidowe, poprzez ich wiązanie z receptorami zlokalizowanymi w rogach tylnych rdzenia kręgowego. W drugim zastosowanym teście, zwanym podeszwowym, odruch cofnięcia bądź lizania kończyny wskutek drażnienia bodźcem termicznym jest odruchem nadrdzeniowym. Obserwowany efekt analgetyczny jest więc pochodną wiązania się związków opioidowych z receptorami zlokalizowanymi m.in. w PAG czy RVM.

W obu testach behawioralnych efekt analgetyczny wywołany przez badane peptydy opioidowe był hamowany przez niespecyficznego antagonistę receptorów opioidowych - naltrekson, co potwierdza założenie że obserwowany efekt przeciwbólowy ma charakter opioidowy. W teście cofania ogona badane peptydy opioidowe charakteryzowały się odmiennym czasem pojawienia się efektu analgetycznego oraz długością jego trwania. Po podaniu bifaliny analgezję obserwowano w przypadku wszystkich dawek już po 5min. od podania. Peptyd 5311 wywoływał słabszą od bifaliny odpowiedź w 5min. eksperymentu, jednak jego maksymalny efekt analgetyczny w 15min. po podaniu był porównywalny do bifaliny. Analgezja utrzymała się natomiast dłużej i była silniejsza niż po podaniu bifaliny w 60min. doświadczenia, gdzie zaobserwowano drastyczny spadek analgezji bifalinowej. Pomimo podobnego profilu analgetycznego w celu uzyskania maksymalnego, porównywalnego do bifaliny efektu, analog 5311 musiał zostać podany w dwa razy wyższej dawce. Peptyd ten charakteryzował się w porównaniu do bifaliny oraz peptydu 5320 znacznie wyższymi wartościami EC_{50} , przez co wykazywał znacznie niższy potencjał analgetyczny. Zjawisko to można tłumaczyć np. zwiększoną degradacją peptydu, gdyż mostek hydrazydowy jest ważnym elementem zapewniającym odporność związku na degradację enzymatyczną przez karboksypeptydazy a jego modyfikacje mogą prowadzić do zaburzeń stabilności. Potwierdzeniem tej hipotezy mogą być wyniki badań nad analogami bifaliny, gdzie wstawienie łańcucha $CH_2-CH_2-CH_2$ pomiędzy łącznik $-NH-NH-$ doprowadziło do zmniejszenia aktywności biologicznej (Ballet i wsp. 2008). Wydłużenie łącznika doprowadziło także do zmniejszenia powinowactwa do receptora typu μ (Costa i wsp. 1985), co zgodne jest z uzyskanymi niższymi od bifaliny wartościami powinowactwa dla peptydu 5311. Drugą przyczyną może być mniej efektywny transport przez bariery biologiczne, ze względu na większą masę cząsteczki. Innym profilem analgetycznym charakteryzował się natomiast peptyd 5320. W 5min. eksperymentu po podaniu najwyższej dawki obserwowano znacznie niższy efekt analgetyczny w porównaniu z taką samą dawką bifaliny. Dodatkowo maksymalny efekt analgetyczny dla każdej z dawek wystąpił o 15min. później niż w przypadku związku macierzystego. Przyczyną opóźnionego wywołania w stosunku do bifaliny efektu analgetycznego przez peptyd 5320 może być jego zwiększona polarność.

Zastąpienie lipofilnego aminokwasu [D-Ala²] aminokwasem bardziej hydrofilnym [D-Thr²] mogło negatywnie wpłynąć na transport przez błonowy analogu 5320 oraz wydłużenie się czasu jego transportu do OUN. Z drugiej strony u zwierząt otrzymujących peptyd 5320 po podaniu dawek 15 i 20 μmol/kg analgezja utrzymywała się znacznie dłużej (do 120min.) niż odpowiedź przeciwbólowa wywołana takimi samymi dawkami bifaliny. Zróznicowany czas pojawiania się i trwania odpowiedzi analgetycznej między peptydem 5320 a bifaliną może wynikać z różnic w hydrofilności obu związków. Opioidy hydrofilne charakteryzują się wolniejszym pojawieniem się analgezji oraz posiadają dłuższy czas półtrwania w płynie mózgowo-rdzeniowym niż analgetyki o charakterze lipofilnym takie jak fentanyl czy metadon (Carr i Cousins 1998; Rathmell i wsp. 2005). Toteż dzięki obecności hydrofilnego aminokwasu w strukturze peptydu 5320 jego czas półtrwania w płynie mózgowo-rdzeniowym zwiększył się, co stanowi jedną z hipotez bardziej długotrwałego od bifaliny efektu analgetycznego na poziomie receptorów w rogach tylnych rdzenia kręgowego.

Morfina wykazała największą efektywność w teście cofania ogona spośród wszystkich badanych związków. Wyniki te spójne są z wynikami innych grup badawczych, które wykazały istotną rolę rdzeniowych receptorów opioidowych w odpowiedzi analgetycznej po systemowym podaniu morfiny. Poprzez selektywną eliminację receptorów typu μ w rogach tylnych rdzenia kręgowego w wyniku podania koniugatu dermorfiny z białkiem saporiny inaktywującym rybosomy przez N-glikozylację, doprowadzono do osłabienia antynocyceptywnego działania morfiny (Kline i wsp. 2008). Również podanie drogą intratekalną antagonistów receptorów μ ogranicza odpowiedź analgetyczną po dożylnym podaniu morfiny (Chen i wsp. 2006). Wzrost efektywności morfiny w procesie aktywacji rdzeniowych receptorów opioidowych może wynikać z następującego mechanizmu: morfina wstrzyknięta dożylnie po dotarciu do rdzenia kręgowego w większości wiąże się specyficznie z receptorami opioidowymi: wiązanie niespecyficzne pozostaje niewielkie w przeciwieństwie do lipofilnych analgetyków. Ponadto hydrofilna budowa morfiny nie sprzyja szybkiemu jej przenikaniu z powrotem do krwioobiegu, jak w przypadku lipofilnych cząsteczek, podtrzymując działanie analgetyczne na poziomie rogów tylnych rdzenia kręgowego (Rathmell i wsp. 2005). Interesującą kwestią pojawiającą się

w wynikach niniejszych badań jest mniejsza, w porównaniu z morfiną, efektywność bifaliny w teście cofania ogona pomimo znacznie większego powinowactwa oraz efektywności w badaniach radioizotopowych. Jedną z hipotez zakłada, iż zjawisko to spowodowane jest większą degradacją enzymatyczną peptydów na co wskazywałby drastyczny spadek analgezji bifalinowej oraz powolniejszy spadek efektu w przypadku peptydów 5320 i 5311 w 60min. po podaniu. Nie jest to jednak hipoteza w pełni wyjaśniająca przyczyny mniej efektywnego działania bifaliny czy jej analogów w porównaniu do morfiny. Dane naszego zespołu oraz innych grup badawczych zajmujących się tą problematyką opisują, że efekt analgetyczny po podaniu bifaliny wprost do rdzenia kręgowego, przewyższa 12-krotnie analgezję wywołaną przez podanie specyficznego agonisty receptorów μ - DAMGO; 7-krotnie etorfiny oraz 400 - 500 krotnie morfiny (Horan i wsp. 1993; Mollica i wsp. 2005; Kosson i wsp. 2008). Proporcja ta zmienia się diametralnie wraz ze zmianą drogi podania. Z danych literaturowych wynika, iż morfina i bifalina prowokują podobny efekt analgetyczny po podaniu systemowym, co sugeruje różnice w zdolności przechodzenia przez bariery biologiczne m.in. barierę krew-mózg/krew rdzeń-kręgowy (BBB) (Lipkowski i wsp. 1982; Silbert i wsp. 1991). Dlatego też, przyczyn tak drastycznego obniżenia zdolności bifaliny do wywoływania analgezji rdzeniowej należy się dopatrywać raczej w mniej efektywnym transporcie przez BBB aniżeli procesie degradacji enzymatycznej. Badania stabilności bifaliny wykazują bowiem, że czas jej półtrwania wynosi 87min. w surowicy oraz 112min. w mózgu (Ballet i wsp. 2008). Za poparciem hipotezy o ograniczonym przechodzeniu bifaliny przez BBB stoją doświadczenia z użyciem znakowanej [¹²⁵I] bifaliny. Wykazują one, iż pomimo wysokiej w porównaniu do innych enkefalin stabilności bifaliny w surowicy, tylko niewielką część znakowanego [¹²⁵I] związku znaleziono w OUN po podaniu systemowym (Farrington i wsp. 1993; Horan i wsp. 1993; Jenkins 2008). Bifalina przenika przez BBB głównie za pomocą dwuetapowego mechanizmu z udziałem transportera dużych obojętnych aminokwasów (LNAAT) (Samuels i Schwartz 1981; Eggleton i wsp. 1998). Dodatkowo bifalina jest dużą cząsteczką o masie molekularnej 1000g/mol co dodatkowo utrudnia jej przenikanie na drodze biernej dyfuzji. Niektóre badania wskazują, że morfina oraz jej aktywny metabolit M6G w fizjologicznym pH występują w formie zjonizowanej przez co

przyjmuje się, że mają słabą zdolność przechodzenia przez lipofilną BBB. M6G w porównaniu ze związkiem macierzystym wykazuje ponad 7-krotnie słabszą, przenikalność przez BBB (Yoshimura i wsp. 1973). Z drugiej jednak strony niektóre dane wskazują, że M6G posiada zdolność eksponowania grup polarnych w warunkach hydrofilnych natomiast w środowisku lipofilnym błon biologicznych posiada zdolność fałdowania, maskując część grup polarnych. Mechanizm ten daje możliwość bardziej efektywnego pasażu przez BBB do OUN na drodze biernej dyfuzji (Carrupt i wsp. 1991). Wiele badań potwierdza, iż przenikanie M6G do OUN oprócz biernej dyfuzji, odbywa się poprzez mechanizm aktywnego transportu z udziałem transportera Oatp2 oraz GLUT-1 (Dagenais i wsp. 2000; Bourasset i wsp. 2003). Przenikanie aktywnego metabolitu morfiny przez BBB oraz w efekcie jego końcowe stężenie w OUN zależne jest od transporterów ABCB1, których zadaniem jest wypompowywanie morfiny i jej metabolitów z OUN (Fujita i wsp. 2010). Dowodem na taki stan rzeczy są doniesienia, że polimorfizm transporterów ABCB1 skorelowany jest ze zmienną odpowiedzią na terapię morfinową u pacjentów leczonych z powodu bólu nowotworowego (Campa i wsp. 2008).

Wysoki współczynnik przenikania przez błony biologiczne, wysoka stabilność oraz selektywność nowych potencjalnych analgetyków jest cechą pożądaną w przypadku leków podawanych doustnie bądź pozajelitowo. Jednakże w przypadku terapii, gdzie zależy nam na lokalnym działaniu jak w przypadku bólu nowotworowego, będącego efektem przerzutów, powyższe cechy mogą okazać się niepożądane. Lipofilne analgetyki łatwo przenikające BBB (np. fentanyl, alfentanyl) po lokalnym podaniu szybko przedostają się do krwioobiegu i wywołują niepożądane efekty uboczne w wyniku wiązania się z receptorami w mózgu, także po podaniu dożylnym (Abram i wsp. 1997). Ponadto, udział obwodowych receptorów opioidowych w przypadku analgetyków łatwo przenikających BBB jest nieistotny z punktu widzenia klinicznego (Khalefa i wsp. 2012). Natomiast analgetyki nie przekraczające BBB, ograniczające swoje działanie tylko do wiązania się z obwodowymi receptorami opioidowymi, mogą okazać się niewystarczające do satysfakcjonującego uśmierzania bólu. Doniesienia literaturowe potwierdzają co prawda udział egzogennej i endogennej obwodowej analgezji opioidowej w klinice, jednak najczęściej jest ona niewystarczająca do

zadawalającego uśmierzania bólu u pacjentów. Głównie z tego powodu prowadzono badania nad stymulacją komórek układu immunologicznego do zwiększonej syntezy peptydów opioidowych przy pomocy wektorów wirusowych zawierających cDNA prekursora enkefalin i endorfin (Braz i wsp. 2001; Lu i wsp. 2002). Ponadto, większość badań nad analgezą obwodową w bólu nowotworowym dotyczy lokalnego podawania niskich, systemowo nieaktywnych dawek opioidów (Baamonde i wsp. 2005).

Niestety w wielu przypadkach lokalne podanie analgetyku, obok dyskomfortu dla pacjenta może okazać się niemożliwe z technicznego punktu widzenia np. w przypadku pojawienia się przeczutów. Stabilne po podaniu dożylnym peptydy opioidowe o ograniczonej zdolności do penetracji BBB umożliwiają kontrolę bólu na dwóch poziomach: obwodowym oraz rdzeniowym, z równoczesnym ograniczeniem działań niepożądanych wynikających z wiązania się do receptorów w mózgu. Dodatkowo mniejsza selektywność dimerycznych enkefalinopodobnych peptydów w stosunku do receptorów opioidowych pozwala na osiągnięcie zjawiska synergii, gdyż oprócz receptora μ udokumentowano ważną rolę receptorów δ w terapii bólu przewlekłego (Vanderah 2010; Otis i wsp. 2011). Argumenty te przemawiają więc za podążaniem za trendem syntezy peptydów opioidowych, charakteryzujących się ograniczoną przenikalnością przez BBB.

Udział analgezji nadrženiowej oraz obwodowej badanych związków analizowano w teście podeszwowym. W patologicznych, przewlekłych stanach bólowych oprócz analgezji nadrženiowej obserwujemy także komponent analgezji obwodowej. Analgezja w teście podeszwowym obserwowana po systemowym podaniu badanych związków jest więc sumarycznym efektem, wynikającym z aktywacji zstępujących szlaków hamowania bólu angażującym receptory opioidowe zlokalizowane w mózgu oraz aktywacji obwodowych receptorów opioidowych (Dennis i wsp. 1980; Ramabadran i Bansinath 1986). Analizowane peptydy opioidowe wywołały w badanych grupach myszy porównywalny nadrženiowy efekt analgetyczny w kończynie kontrolnej (kontralateralnej) nastrzykniętej płynem PBS. Efekt ten był słabszy niż w teście cofania ogona, co wskazuje na możliwość mniej znaczącego udziału nadrženiowych aniżeli rdzeniowych receptorów opioidowych w mechanizmie powstawania analgezji po podaniu bifaliny i jej analogów. W przypadku morfiny

uzyskano natomiast znacznie silniej zaznaczony efekt analgetyczny w teście podszwowy w porównaniu do analizowanych peptydów opioidowych. Oznacza to, iż analgezja morfinowa znacznie silniej związana jest z aktywacją receptorów opioidowych w mózgu. Dane literaturowe potwierdzają powyższe wyniki. Doświadczenia polegające na analizie rodzaju wywoływanej odpowiedzi analgetycznej przez enkefalinową pochodną - [Dmt¹]DALDA (H-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂) oraz morfinę doprowadziły Shimoyama i współpracowników (2008) do podobnych wniosków. Podobnie jak w niniejszej pracy, mechanizm odpowiedzi analgetycznej morfiny był wynikiem porównywalnego udziału receptorów w mózgu i rdzeniu kręgowym, gdyż zarówno w teście cofania ogona jak i teście gorącej płytki otrzymano równie silny efekt przy tej samej dawce. Kwestia porównywalnego udziału receptorów w obu lokalizacjach w mechanizmie analgezji morfinowej jest sprawą dyskusyjną, gdyż niektóre badania wskazują na bardziej znaczący udział receptorów w mózgu niż w rdzeniu kręgowym (Ossipov i wsp. 2010; Khalefa i wsp. 2012). Silniejsze pobudzenie receptorów opioidowych na poziomie rogów tylnych rdzenia kręgowego i w konsekwencji większy udział analgezji rdzeniowej w ogólnych efekcie analgetycznym może być związany z pobudzeniem innych niż opioidowy systemów zaangażowanych w modulację bólu. Hipotezę tę potwierdza zahamowanie zwrotnego wychwytu noradrenaliny przez enkefalinę [Dmt¹]DALDA (Shimoyama i wsp. 2001). Noradrenalina bierze bowiem udział w potencjalizacji analgezji w rdzeniu kręgowym poprzez pobudzenie uwalniania neuroprzekaźników hamujących z warstwy II oraz bezpośrednio hamowanie aktywności neuronów projekcyjnych w warstwie I/III rogów tylnych rdzenia kręgowego (Feng i wsp. 2001; Lu i wsp. 2007).

Podanie bifaliny oraz peptydu 5320 spowodowało wystąpienie porównywalnego efektu analgetycznego w kończynie implantowanej komórami czerniaka B16F0 i kończynie kontrolnej. Efekt ten był natomiast odmienny w przypadku morfiny oraz peptydu 5311, gdzie zaobserwowano wyraźnie niższe wartości odpowiedzi analgetycznej kończyny ipsilateralnej. Wytłumaczeniem takiego stanu rzeczy może być odmienna zdolność morfiny i 5311 do aktywacji obwodowego systemu opioidowego. W modelu bólu zapalnego u myszy pozbawionych obwodowych receptorów opioidowych typu δ na zakończeniach neuronów czuciowych ekspresjonujących kanały

sodowe $\text{Na}_v1.8$ wrażliwe na TTX oraz w modelu bólu neuropatycznego wykazano, iż lokalne oraz dożylnie podanie agonisty receptora δ - SNC80 nie wywołało działania analgetycznego. Wskazuje to na kluczową rolę obwodowych receptorów δ w powstawaniu analgezji w patologicznych stanach bólu przewlekłego. Morfina z racji swego niższego powinowactwa do receptora typu δ niż μ , prawdopodobnie znacznie słabiej niż bifalina czy 5320 aktywuje obwodowe receptory opioidowe typu δ , co przekłada się na słabszy efekt w kończynie ipsilateralnej niż kontralateralnej. W przypadku bifaliny obwodowe receptory opioidowe pełnią natomiast większą rolę w analgezji w teście podszwowy. Wykonane doświadczenia pokazały, iż analgezja w kończynie ipsilateralnej, w której obserwowano hiperalgezę, została częściowo odwrócona przez antagonistę - metylojodek naloksonu, związek blokujący wyłącznie obwodowe receptory opioidowe za sprawą swojej słabej zdolności przenikania BBB. Efekt po podaniu bifaliny oraz NLXM nadal różnił się od kontroli, co wskazuje również na udział analgezji nadrdzeniowej. W kończynie kontralateralnej niewykazującej objawów termicznej hiperalgezji podanie NLXM nie miało natomiast wpływu na całkowity uzyskany efekt analgetyczny, sugerując brak zaangażowania obwodowych receptorów opioidowych. W kończynie kontralateralnej zaobserwowano jednak istotną różnicę w analgezji w 15 oraz 30min. między grupą otrzymującą bifalinę oraz bifalinę i NLXM. Różnice te mogą wynikać z większej przepuszczalności barier biologicznych w kończynie ipsilateralnej, gdyż zjawisko hiperalgezji wiąże się ze zmianami pH mikrośrodowiska tkanki.

W wielu pracach skupiających się na mechanizmach analgezji obwodowej porusza się zjawisko nadekspresji receptorów opioidowych oraz ich wzmożony transport w kierunku obwodowych zakończeń nerwowych w tkance objętej stanem patologicznym. Efekt wzmożonej ekspresji oraz lokalne zmiany mikrośrodowiska w tkance (np. obniżenie pH) powodują zwiększenie aktywności receptorów opioidowych wskutek ich zwiększonej interakcji z białkami G, co pociąga za sobą wzrost siły efektu analgetycznego wywołanego przez endogenne jak i egzogenne peptydy (Zollner i wsp. 2003; Pol i Puig 2004). Na przykładzie mysiego modelu zapalnego bólu trzewnego badane związki tzn. morfina - agonista receptorów μ , SNC80 - niepeptydowy agonista receptorów δ oraz peptydowy agonista receptorów κ -

U50488, posiadają zdolność aktywacji zarówno ośrodkowych jak i obwodowych receptorów opioidowych po podaniu podskórnym. Podanie bowiem zwierzętom NLXM spowodowało częściowe odwrócenie efektu (Labuz i wsp. 2007). Podobne, częściowe odwrócenie efektu po podaniu NLXM zaobserwowano w naszych badaniach, jednak nie można stwierdzić jednoznacznie, czy efekt ten był wynikiem nadekspresji receptorów opioidowych. Konieczne byłoby przeprowadzenie badań na poziomie molekularnym.

W przedstawionym modelu interakcja z obwodowymi receptorami opioidowymi zdaje się zależeć od lokalnego stężenia peptydu. Większy poziom zaangażowania analgezji obwodowej w przypadku bifaliny oraz peptydu 5320 może podobnie jak w przypadku kończyny kontralateralnej wynikać z odmiennych od morfiny możliwości przenikania BBB. Bifalina oraz jej analog 5320, charakteryzujące się niższym od morfiny przenikaniem BBB, wymagają przy podaniu systemowym znacznie wyższej dawki niż przy podaniu intratekalnym aby uzyskać porównywalne do morfiny stężenie w OUN. W konsekwencji stężenie bifaliny oraz analogu 5320 w tkankach obwodowych jest na tyle wysokie aby aktywować obwodowe receptory opioidowe. Iniekcja 20 μ mol/kg bifaliny czy peptydu 5320, wywołująca podobny do morfiny efekt na poziomie rdzenia kręgowego, podane intratekalnie wywołałyby prawdopodobnie kilkaset razy silniejszą analgezję niż morfina. Aby otrzymać podobny analgetyczny efekt obwodowy morfina należałoby podać w bardzo wysokiej dawce, co mogłoby doprowadzić do wystąpienia szeregu niepożądanych efektów ubocznych ze strony OUN u pacjentów będących lub wchodzących w etap choroby wymagający leczenia opioidami. Peptyd 5311, pomimo iż jest analogiem bifaliny, nie odznaczał się znaczącym obwodowym efektem analgetycznym. Odpowiedź przeciwbólowa u myszy po podaniu tego związku była nawet słabsza niż w przypadku morfiny. Taki stan rzeczy może być związany z utrudnioną lokalną dystrybucją peptydu do tkanki ze względu na obecność dłuższego niż bifalina łącznika karbonylodihydrazydowego. Pomimo uzyskania zadowalających proporcji parametrów analgetycznych, iniekcja bifaliny w najwyższej badanej dawce powodowała wystąpienie pewnych efektów niepożądanych u 20% badanych myszy. Zaobserwowano min. objawy związane z przechodzeniem bifaliny do struktur mózgu. Zaliczały się do nich: chwiejny chód oraz pobudzenie psychoruchowe i sztywność

mięśni. U zwierząt po podaniu peptydu 5311 również zaobserwowano powyższe objawy, jednak były one silniejsze i wystąpiły u większej liczby zwierząt. W odróżnieniu od bifaliny i peptydu 5311, peptyd 5320 wywołał u zwierząt łagodniejsze objawy psychoruchowe, co może być związane z większym udziałem receptorów zlokalizowanych w rdzeniu kręgowym. Natomiast w przypadku zwierząt otrzymujących morfinę zaobserwowano objawy sedacji.

Ponieważ w praktyce klinicznej znane jest zjawisko konieczności zwiększania dawki opioidów w schemacie przewlekłego podawania, dlatego badania nad projektowaniem nowych analgetyków oscylują również wokół ograniczenia zjawiska tolerancji opioidowej. Uwzględniając ten trend postanowiono przeprowadzić eksperymenty, w których przez tydzień podawano myszom bifalinę oraz analog 5320 dożylnie w dawce 20 μ mol/kg oraz morfinę dootrzewnowo w dawce 46,8 μ mol/kg. Morfinę podawano dootrzewnowo ze względu na doniesienia literaturowe opisujące mniejszą zdolność do wywoływania efektu tolerancji (Mucha i wsp. 1996). Dawka dootrzewnowo została tak dobrana, aby w szczycie efektu analgetycznego wykazywała porównywalny efekt jak dawka dożylna.

Po tygodniu codziennego podawania związków zaobserwowano wystąpienie zjawiska tolerancji w przypadku wszystkich badanych związków w teście podeszwowym. Najsilniej zjawisko tolerancji zaznaczyło się w kończynie ipsilateralnej oraz w teście cofania ogona u myszy otrzymujących morfinę. W kończynie kontralateralnej również odnotowano spadek efektu analgetycznego w porównaniu z dniem pierwszym, jednakże różnił się on od wartości kontrolnych. Pojawienie się efektu tolerancji w kończynie ipsilateralnej można tłumaczyć faktem, iż morfina wywołuje swoje działanie głównie poprzez wiązanie się z receptorami opioidowymi w OUN, bardziej podatnymi na pojawienie się tolerancji niż receptory obwodowe. W modelach, w których obserwuje się znaczący obwodowy efekt morfiny, nie zaobserwowano obniżenia się obwodowego efektu analgetycznego po jej podawaniu chronicznym w przeciwieństwie do efektu rdzeniowego (Tukuyama i wsp. 1988). W przypadku bifaliny tolerancję zaobserwowano tylko w teście podeszwowym. W odróżnieniu od morfiny w kończynie ipsilateralnej rozwój tolerancji był istotnie słabszy a w kontralateralnej-silniejszy. Różnice pomiędzy oboma związkami mogą

wynikać z większego zaangażowania obwodowych receptorów opioidowych u myszy traktowanych bifaliną i zarazem mniejszą podatnością tego typu analgezji na tolerancję. Peptyd 5320 charakteryzował się porównywalnym poziomem tolerancji w kończynie ipsilateralnej jak bifalina a niższym, podobnym do morfiny, w kontralateralnej. Zjawisko to wskazuje również na rolę obwodowych receptorów opioidowych w obserwowanym efekcie i jego mniejszą podatnością na tolerancję. Peptyd 5320 wykazał również mniejszy spadek nadrdzeniowego efektu analgetycznego w porównaniu z bifaliną, co może być podstawą do stwierdzenia, że jego wolniejsze wiązanie z receptorami w mózgu prowadzi do wystąpienia zjawiska tolerancji. W teście cofania ogona jedynie zwierzęta traktowane morfiną rozwinęły tolerancję, podczas gdy poziom analgezji po podaniu peptydów opioidowych pozostał niezmienny.

Jak już wyżej wspomniano, terapia przeciwnowotworowa nie może obejść się bez równoległego leczenia przeciwbólowego. Idealny lek wiązałby w sobie zarówno silne właściwości przeciwbólowe, ograniczoną ilość działań niepożądanych oraz aktywność antyproliferacyjną czy cytotoksyczną skierowaną tylko w kierunku komórek nowotworowych. Morfina pełni bardzo ważną rolę w paliatywnej terapii bólu u pacjentów w terminalnym stadium choroby nowotworowej. Alkaloid ten uważany jest za złoty standard i nadal pozostaje lekiem z wyboru w uśmierzaniu bólu przewlekłego. Oprócz wielu działań niepożądanych, towarzyszących efektowi przeciwbólowemu wywoływanemu w OUN, wiele dowodów wskazuje na zdolność morfiny do modulacji proliferacji i migracji komórek nowotworowych oraz procesów angiogenezy. Dzisiejszy stan wiedzy pozwala na wysunięcie hipotezy, że morfina podana przewlekłe w wysokich dawkach działa supresyjnie na proliferację komórek nowotworowych. Natomiast przewlekłe stosowanie niskich dawek wykazuje działanie sprzyjające rozwojowi nowotworu. Wykazano również, że morfina w dawkach ważnych z punktu widzenia klinicznego sprzyja niezależnej od systemu opioidowego angiogenezie w przebiegu raka piersi (Gupta i wsp. 2002). Ponadto, poprzez stymulację wydzielania aktywatora plazminogenu typu urokinazy (u-PA) promuje migrację komórek nowotworowych przez macierz zewnątrzkomórkową przyczyniając się do powstawania przerzutów (Nylund i wsp. 2008). W świetle wyników badań ostatnich kilku lat w kwestii potencjalnego zagrożenia w przebiegu przeciwbólowej terapii

morfina wynikającego ze stymulacji procesów tumorogenezy skłania do poszukiwania alternatywnych analgetyków.

Oprócz niekwestionowanych właściwości przeciwbólowych, potwierdzonych w badaniach na zwierzętach i na ludziach, enkefaliny posiadają dodatkowo właściwości przeciwnowotworowe. Stanowią one dodatkową zaletę i przesłankę ku próbom ich stosowania w terapii pacjentów zmagających się z chorobą nowotworową. Doświadczenia przeprowadzone w latach 80-tych wykazały, że podanie enkefalin hamuje rozwój nowotworu pierwotnego oraz hamuje proces przerzutowania komórek linii B16-BL6 do płuc po podskórnej implantacji u myszy (Murgo 1985; Scholar i wsp. 1987). Dodatkowo zaobserwowano zwiększenie aktywności komórek typu NK pełniących ważną rolę w procesach przeciwnowotworowych (Faith i Murgo 1988). Syntetyczne pochodne enkefalin takie jak DADLE, DSLET, DAMGO wykazały także właściwości hamujące proliferację różnych typów linii komórkowych, w tym raka piersi, prostaty, trzustki czy jelita grubego (Hatzoglou i wsp. 1996; Kampa i wsp. 1997; Zagon i McLaughlin 2003). Także badania wpływu związków opioidowych na proliferację komórek glejaka ludzkiego linii T98G wykazały, że morfina stymuluje a bialina hamuje ich proliferację (Lazarczyk i wsp. 2010)

Obserwowany efekt przeciwnowotworowy w wielu badaniach okazał się być odwracalny w obecności nioselektywnego antagonisty receptorów opioidowych - naloksonu. Zasadnym staje się więc podjęcie badań zmierzających ku określeniu potencjału przeciwnowotworowego analogów endogennych enkefalin, wykazujących wysokie powinowactwo do receptorów opioidowych. W niniejszych badaniach skupiono się więc także na wpływie badanych peptydów opioidowych na przeżywalność komórek nowotworowych czerniaka *in vitro*. Spośród analizowanych związków jedynie analog 5320 w najwyższej badanej dawce 100 μ M dodany do hodowli ludzkich komórek czerniaka linii MEW 155 spowodował wzrost liczby komórek martwych oraz spadek żywych, nie wpływając jednocześnie na liczbę prawidłowych fibroblastów. Na podstawie niniejszych badań nie można określić mechanizmu wpływu peptydu 5320 na komórki MEW 155 i jednoznacznie stwierdzić czy mechanizm ten opiera się na hamowaniu proliferacji czy też cytotoksyczności. Niemniej jednak należy zwrócić uwagę na doniesienia potwierdzające zarówno cytotoksyczne (Hayashi i wsp.

2002) jak i antyproliferacyjne działanie enkefalin (Horvat i wsp. 2009). Zarówno hamowanie jak i brak właściwości stymulujących przeżywalność komórek czerniaka *in vitro* przez badane peptydy opioidowe jest pozytywnym wynikiem, zwiększającym bezpieczeństwo stosowania potencjalnego kandydata na analgetyk u pacjentów z problemami onkologicznymi.

Na podstawie wyników uzyskanych w przeprowadzonych doświadczeniach można przyjąć, iż podjęty kierunek badań w celu uzyskania nowych analgetyków o budowie peptydowej w celu uśmierzenia bólu nowotworowego jest obiecujący. Trafność idei syntezy dimerycznych pochodnych enkefalin charakteryzujących się wysokim powinowactwem do receptorów opioidowych μ oraz δ , ograniczoną przenikalnością do OUN, silniejszym efektem obwodowym i przejawiających właściwości przeciwnowotworowe znalazła potwierdzenie w użytym w niniejszych badaniach mysim modelu bólu nowotworowego. Zwiększenie udziału analgezji obwodowej wynikającego z organicznej penetracji BBB pozwoliło na uzyskanie silniejszego, miejscowego efektu przeciwbólowego oraz pojawienie się łagodniejszych objawów niepożądanych.

6. WNIOSKI

1. Bifalina oraz peptydy 5320 oraz 5311 po podaniu dożylnym wywołują zależny od dawki i czasu efekt analgetyczny związany z aktywacją receptorów opioidowych.
2. Peptyd 5320, dzięki większym niż bifalina hydrofilnym właściwościom wywołuje bardziej długotrwały ośrodkowy i obwodowy efekt przeciwbólowy.
3. Ograniczone przenikanie przez BBB powoduje, że dożylnie podawane dawki peptydów, w doświadczeniu ostrym oraz przewlekłym, niezbędne do wywołania efektu analgetycznego w OUN są na tyle duże, że znacznie efektywniej niż morfina aktywują system opioidowy w miejscu zmienionym nowotworowo.
4. Badane peptydy opioidowe posiadają mniejszą zdolność indukowania zjawiska tolerancji na poziomie rdzenia kręgowego niż morfina.
5. Peptyd 5320, poza oczekiwanym działaniem analgetycznym, ogranicza liczbę komórek ludzkiego czerniaka w hodowli *in vitro*, co potencjalnie może wspomagać terapię przeciwnowotworową.

7. STRESZCZENIE

Przewlekły ból towarzyszący chorobie nowotworowej stanowi poważny problem medyczny wpływający w znaczący sposób na obniżenie jakości życia pacjenta oraz na jego wykluczenie społeczne i zawodowe. Dlatego też leczenie przeciwnowotworowe nie może obejść się bez równoległej kontroli objawów bólowych doświadczanych przez chorego. Jednakże pomimo szeregu zaleceń Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w kwestii farmakoterapii bólu w chorobie nowotworowej, adekwatna jego kontrola pozostaje wciąż problemem. Składa się na to wiele czynników jak złożona etiologia bólu pociągająca za sobą trudności w jego zaklasyfikowaniu i dobraniu leczenia, brak dostatecznej wiedzy na temat dostępnych terapii, ograniczony zasób dostępnych analgetyków oraz związane z terapią działania niepożądane. Opioidy stanowią bardzo istotną grupę związków stosowanych w uśmierzaniu zarówno bólu o umiarkowanym jak i silnym natężeniu. Przewlekłe podawanie np. morfiny – prototypowego leku w terapii umiarkowanego bądź silnego bólu wiąże się niestety z wystąpieniem szeregu działań niepożądanych takich jak: tolerancja, depresja oddechowa, nudności oraz sedacja wynikających z przenikania opioidów przez BBB do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Przewlekłe stosowanie morfiny wiąże się także z ryzykiem stymulacji procesu tumorigenezy. Biorąc pod uwagę ryzyko wynikające z przewlekłej terapii przeciwbólowej opioidami konieczne jest wzbogacenie wachlarza dostępnych analgetyków o związki charakteryzujące się nie tylko silnym działaniem analgetycznym ale także niższą zdolnością do wywoływania działań niepożądanych oraz brakiem działania stymulującego rozwój nowotworu.

Spełnienie powyższych wymagań zakłada użycie stabilnych, dimerycznych pochodnych enkefalin o ograniczonym przenikaniu BBB, oddziałujących z obwodowymi i ośrodkowymi receptorami opioidowymi. Jednym z głównych celów pracy była analiza działania przeciwbólowego trzech pochodnych enkefalin - bifaliny oraz dwóch jej analogów: peptydu 5320 oraz 5311 w mysim modelu bólu nowotworowego wywołanego poprzez podskórną implantację komórek czerniaka linii B16F0 w podeszwę tylnej stopy myszy szczepu C57BL6. Badania skupiły się na zbadaniu wpływu zmian strukturalnych w cząsteczce bifaliny na parametry powinowactwa,

efektywności oraz potencjału związków w badaniach radioizotopowych; określeniu zaangażowania receptorów opioidowych ośrodkowych i obwodowych w sumarycznym efekcie analgetycznym wywoływanym przez bifalinę oraz peptydy 5320 i 5311 *in vivo*; zbadaniu pojawienia się tolerancji opioidowej po przewlekłym podawaniu badanych związków oraz zbadaniu ich właściwości przeciwnowotworowych *in vitro*.

Wybór pochodnych enkefalin umotywowany był doniesieniami, iż endogenne enkefaliny posiadają imponujące działanie przeciwbólowe. Ich skuteczność analgetyczna oraz właściwości hamowania proliferacji komórek nowotworowych, przerzutowania oraz stymulują naturalnych mechanizmów odpowiedzi przeciwnowotworowej (np. stymulacja komórek NK) stanowią dodatkowy atut. Stabilność w surowicy zapewnia możliwość podawania peptydów drogą dożylną, gdyż lokalne podanie potencjalnego leku pacjentowi nie zawsze jest możliwe ze względu na lokalizację nowotworu. Brak selektywności w stosunku do jednego typu receptora oraz budowa dimeryczna badanych peptydów opioidowych sprzyja natomiast prowokowaniu synergistycznej odpowiedzi analgetycznej. Przez długi czas sądzono, iż klinicznie istotny efekt przeciwbólowy jest wynikiem wiązania się związków opioidowych z receptorami zlokalizowanymi w OUN. Jednakże w sytuacji wystąpienia stanu patologicznego w tkance wskutek np. zapalenia, neuropatii obwodowej czy też obecności nowotworu lokalne podanie opioidów efektywnie znosi objawy hiperalgezji czy allodynii. Zjawisko to zwane analgezią obwodową jest wynikiem aktywacji receptorów opioidowych na zakończeniach obwodowych nerwów czuciowych i stanowi ważny aspekt w projektowaniu nowych związków przeciwbólowych do terapii bólu nowotworowego. Taki mechanizm działania pozwala na znoszenie objawów bólowych w miejscu rozwoju nowotworu oraz ogranicza wystąpienie działań niepożądanych ze strony OUN. Projektowanie analgetyków o ograniczonym przenikaniu BBB pozwala na osiągnięcie takiego stężenia związku w tkankach obwodowych, które pozwala na efektywną stymulację obwodowych receptorów opioidowych w warunkach procesu nowotworzenia.

Kompetycyjne badania z użyciem znakowanych trytem specyficznych agonistów receptora μ - [H^3]DAMGO oraz δ - [H^3]Deltorfiny II wykazały, iż modyfikacje strukturalne bifaliny miały niewielki wpływ na obniżenie powinowactwa do receptorów

opiodowych analogów 5320 oraz 5311. Obniżenie powinowactwa do receptorów μ i δ wynikały prawdopodobnie z podstawienia większego aminokwasu [D-Thr²] w miejsce [D-Ala²] sekwencji peptydowej 5320 a niższe powinowactwo 5311 do receptora μ spowodowane było zastąpieniem mostka hydrydowego łącznikiem karbonylodihydrydowym. Modyfikacje strukturalne analogów bifaliny nie miały wpływu na efektywność z jaką stymulowały one wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe zależne od białka G w analizie [³⁵S]GTP γ S. Efektywność 5320 i 5311 była porównywalna z bifaliną a silniejsza od specyficznego pełnego agonisty - DAMGO oraz znacznie wyższa od częściowego agonisty - morfiny.

W badaniach farmakologicznych przeprowadzonych na zastosowanym modelu bólu nowotworowego analogi bifaliny wykazały odmienny od związku macierzystego profil farmakologiczny. Peptyd 5320 z racji obecności w swoim łańcuchu hydrofilnego aminokwasu [D-Thr²] charakteryzował się opóźnionym pojawieniem się analgezji rdzeniowej oraz nadrdzeniowej w porównaniu do bifaliny. Dzięki bardziej hydrofilnym właściwościom peptyd 5320 utrzymywał swoje działanie przeciwbólowe przez okres 60min. na poziomie nadrdzeniowym oraz przez 120min. na poziomie rdzenia kręgowego. Natomiast rdzeniowy efekt przeciwbólowy bifaliny utrzymywał się o godzinę krócej a nadrdzeniowy – o pół godziny krócej. Peptyd 5311 wykazywał podobny do bifaliny profil analgetyczny w czasie, jednak odznaczał się znacznie niższym potencjałem analgetycznym i w celu uzyskania maksymalnego, porównywalnego do bifaliny efektu, analog 5311 musiał zostać podany w dwa razy wyższej dawce. Zjawisko to może być związane ze zwiększoną degradacją peptydu, wskutek modyfikacji mostka hydrydowego, będącego elementem zapewniającym odporność na degradację enzymatyczną.

Doświadczenia farmakologiczne potwierdziły również zróżnicowany udział ośrodkowych oraz obwodowych receptorów opiodowych w odpowiedzi przeciwbólowej uzyskanej po dożylnym podaniu badanych peptydów opiodowych oraz morfiny. Morfina w znacznie wyższym stopniu niż bifalina i jej analogi wywoływała odpowiedź analgetyczną poprzez wiązanie się z receptorami opiodowymi zlokalizowanymi w mózgu i rdzeniu kręgowym. Natomiast bifalina w większym stopniu niż morfina czy analog 5311 manifestowała swoje działanie analgetyczne poprzez

obwodowe receptory opioidowe, gdyż wcześniejsze podanie niespecyficznego, nieprzenikającego przez BBB antagonisty - metylojodku naloksonu doprowadziło do znacznego obniżenia się odpowiedzi przeciwbólowej po jej podaniu. Większe zaangażowanie analgezji obwodowej w obserwowanym efekcie analgetycznym w przypadku bifaliny wynika z odmiennych od morfiny możliwości przenikania BBB. Bifalina oraz (prawdopodobnie również jej analog 5320) charakteryzująca się niższym od morfiny przenikaniem BBB i wymaga przy podaniu systemowym znacznie wyższej dawki niż przy podaniu intratekalnym aby uzyskać porównywalną do morfiny odpowiedź analgetyczną w OUN. W konsekwencji stężenie bifaliny w tkankach obwodowych jest dostatecznie wysokie aby wywołać znacznie silniejszy obwodowy efekt analgetyczny. Po podaniu ostrym bifalina oraz peptyd 5320 spowodowały wystąpienie działań niepożądanych takich jak pobudzenie psychoruchowe u 20% zwierząt podczas, gdy morfina spowodowała wystąpienie sedacji u większości zwierząt. Przy przewlekłym traktowaniu myszy 20 μ mol/kg bifaliny i peptydu 5320 zaobserwowano także mniejszy rozwój tolerancji ośrodkowej niż w przypadku morfiny. Dodatkowo analog 5320 w stężeniu 100 μ M wykazał aktywność przeciwnowotworową *in vitro*, ograniczając liczę żywych oraz zwiększając liczbę martwych komórek nowotworowych ludzkiego czerniaka linii MEW 155.

Podsumowując, wyniki niniejszej pracy potwierdzają potencjalne korzyści terapeutyczne bifaliny oraz jej analogu – 5320 w bólu nowotworowym. Wskazują na słuszność idei projektowania nowych dimerycznych analgetyków o ograniczonym przechodzeniu BBB, zwiększających udział analgezji obwodowej w sumarycznym efekcie analgetycznym.

Słowa kluczowe: ból nowotworowy, analgezja obwodowa, bifalina, dimeryczne analogi enkefalin

8. ABSTRACT

Malignant, long-lasting pain is an immanent component of cancer that significantly decreases the patients' quality of life and represents a growing medical problem for researchers and clinicians worldwide. Thus, chronic anti-cancer therapy must be paired with adequate pain relief to ensure the patients' physical and mental well-being.

The World Health Organizations (WHO) guidelines ensure a decent pharmacological control of cancer-related pain in most patients but the problem of inadequate pain-relief still exists. Many factors contribute to the difficulties in cancer pain treatment. A multifactorial and complex character of cancer pain makes it troublesome to classify and assess therefore hampering drug matching. More issues include insufficient knowledge of available therapies, a limited range of analgesics and burdensome therapy-associated side effects. For many decades opioids have been the mainstay analgesics for treatment of moderate to severe pain conditions in accordance with the WHO three-step analgesic ladder. Analgesics that readily cross the blood-brain-barrier (BBB) produce a desirable analgesic effect as a result of opioid receptor binding in the central nervous system (CNS). On the other hand, unwanted side effects are also triggered as a result of sufficient BBB permeability, especially under chronic treatment. Long-term treatment with e.g morphine a prototypic alkaloid analgesic is associated with intolerable CNS-mediated side effects such as opioid tolerance, respiratory depression, nausea, sedation, mental confusion. Morphine has also been shown to stimulate tumor growth, metastasis and angiogenesis. In light of these risks involved in sustained morphine treatment it is adequate to enrich the current available pain-relief therapies with opioids producing strong analgesia but devoid of side effects and tumor stimulating properties. The fulfillment of these requirements could be met by the design of new, stable dimeric enkephalin derivatives showing limited BBB permeability and activating both central and peripheral opioid receptors. Thus, one of the key aims of this work was to investigate the analgesic activity of three enkephalin analogs: biphalin and two biphalin derivatives codenamed peptide 5320 and peptide 5311 in a mouse model of local cancer pain produced by an intraplantar injection of B16F0 melanoma cells into the hind paw of male C57BL6 mice.

The studies involving biphalin and its analogs 5320 and 5311 also focused on: the influence of structural alterations in the biphalin peptide chain on opioid receptor affinity, efficacy and potency in radioligand binding experiments; assessment of a relative contribution of peripheral versus central opioid receptors in the total analgesic effect *in vivo*; the occurrence of opioid tolerance after chronic exposure in comparison to morphine; *in vitro* evaluation of a putative anti-tumor effect.

The selection of enkephalin derivatives was justified by previous reports claiming that natural endogenous enkephalins possess impressive antinociceptive properties. Apart from high analgesic potency enkephalins also reduce tumor cell proliferation and metastasis and promote stimulation of innate immunological anti-tumor response. These properties are additional valuable assets in terms of prolonged treatment. The introduction of D-amino acids in the peptide chain ensure serum stability that enables systemic delivery of opioid peptides when local drug injection is limited due to e.g tumor localization. The lack of receptor selectivity and a dimeric structure of biphalin and its analogs favours a synergic analgesic response exceeding in strength an additive response of separately administered pharmacophores.

It has long been thought that clinically-relevant analgesia can be achieved by binding of opioid compounds to opioid receptors located in the CNS. However, an substantial body of evidence suggests that also receptors located on primary afferent peripheral terminals contribute to the analgesic effect of opioids. Peripheral analgesia especially gains in importance in pathological pain as a result of peripheral inflammation, neuropathy and/or local tumor growth. In these conditions a local administration of opioids activates peripheral opioid receptors in the tissue alleviating hiperalgesia or allodynia and simultaneously reducing the occurrence of CNS-related unwanted side effects. Limited BBB permeability is an important aspect in the design of novel opioid peptide analgesics triggering peripheral analgesia. Owing to a reduced BBB crossing the concentration of a drug in peripheral cancer-invaded tissue is high enough to produce a substantial peripheral opioid receptor-mediated effect.

Competitive radioligand binding studies using μ - and δ specific radiolabelled probes - [H^3]DAMGO and [H^3]Deltorphin II have shown that structural modifications of biphalin had a minor, but yet statistically significant effect on 5320 and 5311 receptor binding affinity. Lower μ - and δ binding affinity presumably resulted from the substitution of [D-Ala²] by a bulkier [D-Thr²] in the 5320 analog peptide chain. Subsequently, the replacement of the hydrazide bridge by a carbonylodihydrazide linker resulted in the reduction of μ opioid receptor affinity of the 5311 analog. Structural modifications of both biphalin analogs did not affect their effectiveness in stimulating intracellular G-protein mediated signaling pathways in the [^{35}S]GTP γ S

assay. The effectiveness of 5320 and 5311 was comparable to biphalin and significantly higher than in the case of a specific full agonist - DAMGO and a partial agonist - morphine.

In pharmacological studies conducted on tumor-bearing mice biphalin analogs displayed a different analgesic profile than the parent compound. Owing to the introduction of a hydrophilic amino acid [D-Thr²] the 5320 peptide showed a delayed onset of both spinal and supraspinal analgesia compared to biphalin. On the other hand, 5320 induced a longer-lasting supraspinal and spinal analgesic effect that persisted for an hour and two hours post-injection respectively. The 5311 peptide expressed a similar time course profile of analgesia to biphalin but showed much weaker potency and had to be administered in a two times higher dose to achieve a equipotential effect. This phenomenon might be due to enhanced enzymatic degradation as a result of the hydrazide bridge modifications that limit bioavailability of dimeric opioid peptides. Pharmacological data confirmed a differential contribution of central and peripheral opioid receptors in analgesia evoked by systemic intravenous injection of analyzed opioid peptides and morphine. Morphine evoked a stronger spinal and supraspinal analgesic response while biphalin as opposed to morphine and 5311, more profoundly manifested its analgesic action via peripheral opioid receptors. This notion was supported by a considerable reversal of analgesia in the tumor-bearing paw by a preemptive injection of a peripherally restricted opioid receptor antagonist - naloxone methiodide. A stronger contribution of peripheral analgesia in the overall analgesic effect of biphalin is a result of limited BBB permeability of biphalin. Biphalin when given intrathecally produces analgesia five orders of magnitude stronger than morphine but when given via the systemic route requires a much higher dose to match the analgesic effect of morphine in the CNS. Consequently, the concentration of biphalin in peripheral tissue is high enough to evoke a stronger analgesic response. However, a single injection of biphalin and 5320 provoked the occurrence of unwanted side effects such as psychomotor agitation in 20% of mice, whereas morphine had a sedative effect in most animals. After a seven day chronic treatment 20µmol/kg of biphalin and 5320 evoked a slower appearance of central tolerance than morphine. Additionally, the 5320 peptide in a concentration of 100µM showed anti-tumor

properties *in vitro* by reducing the number of live and increasing the number of dead human MEW 155 melanoma cells.

In summary, the results of the current work confirm the potential therapeutic advantages of biphalin and 5320 in local cancer pain mouse model. Obtained data support the idea of synthesis of new dimeric opioid peptide analgesics with limited access to the CNS that efficiently activate peripheral opioid receptors to alleviate cancer pain.

Keywords: cancer pain, peripheral analgesia, biphalin, dimeric enkephalin analogs

9. LITERATURA

Abbruscato TJ, Williams SA, Misicka A, Lipkowski AW, Hruby VJ, Davis TP. (1996) Blood-to-central nervous system entry and stability of biphalin, a unique double-enkephalin analog, and its halogenated derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 276:1049-1057.

Abram SE, Mampilly GA, Milosavljevic D. (1997) Assessment of the potency and intrinsic activity of systemic versus intrathecal opioids in rats. *Anesthesiology* 87:127-134.

Advokat C, Rhein FQ. (1995) Potentiation of morphine-induced antinociception in acute spinal rats by the NMDA antagonist dextrorphan. *Brain Res* 699:157-160.

Aicher SA, Punnoose A, Goldberg A. (2000) mu-Opioid receptors often colocalize with the substance P receptor (NK1) in the trigeminal dorsal horn. *J Neurosci* 20:4345-4354.

Aimone LD, Yaksh TL. (1989) Opioid modulation of capsaicin-evoked release of substance P from rat spinal cord in vivo. *Peptides* 10:1127-1131.

Akil H, Meng F, Mansour A, Thompson R, Xie GX, Watson S. (1996) Cloning and characterization of multiple opioid receptors. *NIDA Res Monogr* 161:127-140.

Al-Chaer ED, Traub RJ. (2002) Biological basis of visceral pain: recent developments. *Pain* 96:221-225.

Allan Lipton A, Theriault RL, Hortobagyi, GN, Simeone J, Knight RD, Mellars K, Reitsma DJ, Heffernan M, Seaman JJ. (2000) Pamidronate prevents skeletal complications and is effective palliative treatment in women with breast carcinoma and osteolytic bone metastases: long term follow-up of two randomized, placebo-controlled trials. *Cancer* 88 1082-1090.

Allen RM, Dykstra LA. (1999) The competitive NMDA receptor antagonist LY235959 modulates the progression of morphine tolerance in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 142:209-214.

Amadesi S, Cottrell GS, Divino L, Chapman K, Grady EF, Bautista F, Karanjia R, Barajas-Lopez C, Vanner S, Vergnolle N, Bunnett NW. (2006) Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase Cepsilon- and A-dependent mechanisms in rats and mice. *J Physiol* 575:555-571.

Ambinder RF, Schuster MM. (1979) Endorphins: new gut peptides with a familiar face. *Gastroenterology* 77:1132-1140.

Antonijevic I, Mousa SA, Schäfer M, Stein C. (1995) Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. *J Neurosci* 15:165-172.

- Baamonde A, Lastra A, Juarez L, García V, Hidalgo A, Menendez L. (2005) Effects of the local administration of selective mu-, delta-and kappa-opioid receptor agonists on osteosarcoma-induced hyperalgesia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372:213-219.
- Bagnol D, Mansour A, Akil H, Watson SJ. (1997). Cellular localization and distribution of the cloned mu and kappa opioid receptors in rat gastrointestinal tract. *Neurosci*, 81:579-591.
- Baker L, Hyrien O, Ratka A . (2003) Contributions of morphine-3- glucuronide and morphine-6-glucuronide to differences in morphine analgesia in humans. *Am J Pain Manage* 13:16-28.
- Ballet S, Mauborgne A, Benoliel JJ, Bourgoin S, Hamon M, Cesselin F, Collin E. (1998) Polyarthritis-associated changes in the opioid control of spinal CGRP release in the rat. *Brain Res* 796:198-208.
- Ballet S, Pietsch M, Abell AD. (2008) Multiple ligands in opioid research. *Protein Pept Lett* 15:668-682.
- Bardoni R, Torsney C, Tong CK, Prandini M, MacDermott AB. (2004) Presynaptic NMDA receptors modulate glutamate release from primary sensory neurons in rat spinal cord dorsal horn. *J Neurosci* 24:2774-2781.
- Basbaum AI, Fields HL. (1984) Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 7:309-338.
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC. (2002) Control of synaptic strength by glial TNF alpha. *Science* 295:2282-2285.
- Bedini A, Baiula M, Gentilucci L, Tolomelli A, De Marco R, Spampinato S. (2010) Peripheral antinociceptive effects of the cyclic endomorphin-1 analog c[YpwFG] in a mouse visceral pain model. *Peptides* 31:2135-2140.
- Belcheva MM, Clark AL, Haas PD, Serna JS, Hahn JW, Kiss A, Coscia CJ. (2005) Mu and kappa opioid receptors activate ERK/MAP kinase via different PKC isoforms and secondary messengers in astrocytes. *J Biol Chem* 280:27662-27669.
- Benard A, Boue J, Chapey E, Jaume M, Gomes B, Dietrich G. (2008) Delta opioid receptors mediate chemotaxis in bone marrow-derived dendritic cells. *J Neuroimmunol* 197:21-28.
- Benard A, Boue J, Chapey E, Jaume M, Gomes B, Dietrich G. (2008) Delta opioid receptors mediate chemotaxis in bone marrow-derived dendritic cells. *J Neuroimmunol* 197:21-28.

Bennett GJ, Xie YK. (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.

Bennett MI, Smith BH, Torrance N, Lee AJ. (2006) Can pain be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. *Pain* 122: 289-294.

Besse D, Weil-Fugazza J, Lombard MC, Butler SH, Besson JM. (1992) Monoarthritis induces complex changes in mu-, delta- and kappa-opioid binding sites in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Eur J Pharmacol* 223:123-131.

Besson JM. (1999) The neurobiology of pain. *Lancet* 353:1610-1615.

Beyreuther BK, Callizot N, Brot MD, Feldman R, Bain SC, Stöhr T. (2007) Antinociceptive efficacy of lacosamide in rat models for tumor- and chemotherapy-induced cancer pain. *Eur J Pharmacol* 565:98-104.

Bidlack JM, Hemmick LM. (1990) Morphine enhancement of mitogen-induced T-cell proliferation. *Prog Clin Biol Res* 328:405-408.

Bidlack JM. (2000). Detection and function of opioid receptors on cells from the immune system. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:719-723.

Bigliardi-Qi M, Gaveriaux-Ruff C, Zhou H, Hell C, Bady P, Rufli T, Kieffer B, Bigliardi P. (2006) Deletion of delta-opioid receptor in mice alters skin differentiation and delays wound healing. *Differentiation* 74:174-185.

Bigliardi-Qi M, Sumanovski LT, Buchner S, Rufli T, Bigliardi PL. (2004). Mu-opiate receptor and β -endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in human skin. *Dermatology* 209:183-189.

Bilecki W, Przewlocki R. (2000) Effect of opioids on Ca^{2+} /cAMP responsive element binding protein *Acta Neurobiol Exp* 60:557:567.

Bilsky EJ, Inturrisi CE, Sadee W, Hruby VJ, Porreca F. (1996) Competitive and non-competitive NMDA antagonists block the development of antinociceptive tolerance to morphine, but not to selective mu or delta opioid agonists in mice. *Pain* 68:229-237.

Binning AR, Przesmycki K, Sowinski P, Morrison LM, Smith TW, Marcus P, Lees JP, Dahan A. (2011) A randomised controlled trial on the efficacy and side-effect profile (nausea/vomiting/sedation) of morphine-6-glucuronide versus morphine for post-operative pain relief after major abdominal surgery. *Eur J Pain* 15:402-408.

Bodenham A, Quinn K, Park GR. (1989) Extrahepatic morphine metabolism in man during the anhepatic phase of orthotopic liver transplantation. *Br J Anaesth* 63:380-384.

Bonica JJ. (1982) Report on epidemiology of cancer pain. Meeting of the National Cancer Institute, USA.

Bourasset F, Cisternino S, Temsamani J, Scherrmann JM. (2003) Evidence for an active transport of morphine-6- β -D-glucuronide but not P-glycoprotein-mediated at the blood-brain barrier. *J Neurochem* 86:1564-1567.

Bouvier M. (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter μ , σ , κ , receptors. *Nat Rev Neurosci* 2: 274-286.

Boyadjieva N, Dokur M, Advis JP, Meadows GG, Sarkar DK. (2001). Chronic ethanol inhibits NK cell cytolytic activity: role of opioid peptide β -endorphin. *J. Immuno* 167:5645-5652.

Boyette-Davis JA, Cata JP, Zhang H, Driver LC, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Dougherty PM. (2011) Follow-up psychophysical studies in bortezomib-related chemoneuropathy patients. *J Pain* 12:1017-1024.

Braz J, Beaufour C, Coutaux A, Epstein AL, Cesselin F, Hamon M, Pohl M. (2001) Therapeutic efficacy in experimental polyarthritis of viral-driven enkephalin overproduction in sensory neurons. *J Neurosci* 21:7881-7888.

Bunzow JR, Saez C, Mortrud M, Bouvier C, Williams JT, Low M, Grandy DK. (1994) Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett* 347:284-288.

Burgoyne LL, Billups CA, Jiron JL Jr, Kaddoum RN, Wright BB, Bikhazi GB, Parish ME, Pereiras LA. (2012) Phantom limb Pain in Young Cancer-Related Amputees: Recent Experience at St Jude Children's Research Hospital. *Clin J Pain* 28:222-225.

Burnstock G. (2009) Purinergic mechanosensory transduction and visceral pain. *Mol Pain* 5:69.

Bussiere JL, Adler MW, Rogers TJ, Eisenstein TK. (1993) Effects of in vivo morphine treatment on antibody responses in C57BL/6 bgJ/bgJ (beige) mice. *Life Sci* 52:PL43-48.

Cadet P, Bilfinger TV, Fimiani C, Peter D, Stefano GB. (2000). Human vascular and cardiac endothelia express mu opiate receptor transcripts. *Endothelium*, 7:185-191.

Cain DM, Khasabov SG, Simone DA. (2001) Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: An in vivo study. *J Neurophysiol* 85:1561-1574.

- Campa D, Gioia A, Tomei A, Poli P, Barale R. (2008) Association of ABCB1/MDR1 and OPRM1 gene polymorphisms with morphine pain relief. *Clin Pharmacol Ther* 83:559-566.
- Campbell JN, Raja SN, Cohen RH, Manning DC, Meyer RA. (1989) Peripheral neuronal mechanisms of nociception, in: Wall PD, Melzack R (Eds.) *Textbook of Pain*, Churchill Livingstone, Edinburgh, London pp. 22-45.
- Cao YQ, Mantyh PW, Carlson EJ, Gillespie A, Epstein CJ, Basbaum A. (1998) Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* 392:390-394.
- Carr DB, Cousins MJ. (1998) Spinal route of analgesia. Opioids and future options. Cousins MJ, Bridenbaugh PO editors. *Neural blockade in clinical anesthesia and management of pain*, 3rd ed., New York: Lippincott-Raven Publishers 915-983.
- Carrupt PA, Testa B, Bechalany A, El Tayar N, Descas P, Perrissoud D. Morphine-6 glucuronide and morphine-3-glucuronide as molecular chameleons with unexpected lipophilicity. *J Med Chem* 34:1272-1275.
- Casellas AM, Guardiola H, Renaud FL. (1991) Inhibition by opioids of phagocytosis in peritoneal macrophages. *Neuropeptides* 18:35-40.
- Cervero F, Laird JM. Visceral pain. (1999) *Lancet* 353:2145-2148.
- Cervero F. (1996) Visceral nociceptors. In: Belmonte C, Cervero F, eds. *Neurobiology of Nociceptors*. Oxford, England. *Oxford University Press* 220-240.
- Cetin B, Buyukberber S, Sentürk S, Güzel E, Coskun U, Benekli M. (2011) Ischemic colitis after capecitabine plus cisplatin treatment in advanced gastric cancer. *J Thromb Thrombolysis* 31:503-506.
- Chadzinska M. (2007) Układ opioidowy a odpowiedź wrodzona - badania porównawcze. I. Opioidy i receptory opioidowe. *Postępy Biol Komórki* 34:251:262.
- Chakrabarti S, Liu NJ, Gintzler AR. (2003) Reciprocal modulation of phospholipase C-beta isoforms: adaptation to chronic morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13686-13691.
- Chapman V, Haley JE, Dickenson AH. (1994) Electrophysiologic analysis of preemptive effects of spinal opioids on N-methyl-D-aspartate receptor-mediated events. *Anesthesiology* 81:1429-1435.
- Chaturvedi K, Christoffers KH, Singh K, Howells RD. (2000) Structure and regulation of opioid receptors. *Biopolymers* 55:334-346.

Chen Y, Fan Y, Liu J, Mestek A, Tian M, Kozak CA, Yu L. (1994) Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS Lett* 347:279-283.

Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L. (1993) Molecular cloning and functional expression of a μ -opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 44:8-12.

Chen SR, Pan HL. (2006) Blocking mu opioid receptors in the spinal cord prevents the analgesic action by subsequent systemic opioids. *Brain Res* 1081:119–125.

Cheng ZF, Fields HL, Heinricher MM. (1986) Morphine microinjected into the periaqueductal gray has differential effects on 3 classes of medullary neurons. *Brain Res* 375:57-65.

Choi Y, Chuang LF, Lam KM, Kung HF, Wang JM, Osburn BI, Chuang RY. (1999) Inhibition of chemokine-induced chemotaxis of monkey leukocytes by mu-opioid receptor agonists. *In Vivo* 13:389-396.

Chuang LF, Chuang TK, Killam KF Jr, Chuang AJ, Kung HF, Yu L, Chuang RY. (1994) Delta opioid receptor gene expression in lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 202:1291-1299.

Chuang LF, Chuang TK, Killam KF Jr, Qiu Q, Wang XR, Lin JJ, Kung HF, Sheng W, Chao C, Yu L. (1995) Expression of kappa opioid receptors in human and monkey lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 209:1003-1010.

Coffman BL, Rios GR, King CD, Tephly TR (1997) Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 25:1-4.

Coleman RE. (2006) Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res* 12:6243-6249.

Collin E, Mantelet S, Frechilla D, Pohl M, Bourgoin S, Hamon M, Cesselin F. (1993) Increased in vivo release of calcitonin gene-related peptide-like material from the spinal cord in arthritic rats. *Pain* 54:203-211.

Conrath-Verrier M, Dietl M, Tramu G. (1984) Cholecystokinin-like immunoreactivity in the dorsal horn of the spinal cord of the rat: a light and electron microscopic study. *Neurosci* 13:871-885.

Constantin CE, Mair N, Sailer CA, Andratsch M, Xu ZZ, Blumer MJ, Scherbakov N, Davis JB, Bluethmann H, Ji RR, Kress M. (2008) Endogenous tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) requires TNF receptor type 2 to generate heat hyperalgesia in a mouse cancer model. *J Neurosci* 28:5072-5081.

- Corlew R, Brasier DJ, Feldman DE, Philpot BD. (2008) Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. *Neuroscientist* 14:609-625.
- Costa T, Wuster M, Herz A, Shimohigashi Y, Chen HC, Rodbard D. (1985) Receptor binding and biological activity of bivalent enkephalins. *Biochem Pharmacol* 34:25-30.
- Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. (2005) Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* 72:359-371.
- Cowden-Dahl KD, Robertson SE, Weaver VM, Simon MC. (2005) Hypoxia-inducible Factor Regulates $\alpha\beta 3$ Integrin Cell Surface Expression. *Mol Biol Cell* 16: 1901–1912.
- Coy DH, Kastin AJ, Schally AV, Morin O, Caron NG, Labrie F, Walker JM, Fertel R, Berntson GG, Sandman CA. (1976) Synthesis and opioid activities of stereoisomers and other D-amino acid analogs of methionine-enkephalin. *Biochem Biophys Res Commun* 73:632-638.
- Craig AD. (2003) Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. *Ann Rev Neurosci* 26:1-30.
- Crain SM, Shen KF. (1990) Opioids can evoke direct receptor-mediated excitatory effects on sensory neurons. *Trends Pharmacol Sci* 11:77-81.
- Cruciani RA, Dvorkin B, Morris SA, Crain SM, Makman MH. (1993) Direct coupling of opioid receptors to both stimulatory and inhibitory guanine nucleotide-binding proteins in F-11 neuroblastoma-sensory neuron hybrid cells. *Proc Natl Acad Sci US A* 90:3019-3023.
- Cunha TM, Verri WA Jr, Fukada SY, Guerrero AT, Santodomingo- Garzon T, Poole S, Parada CA, Ferreira SH, Cunha FQ (2007) TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. *Eur J Pharmacol* 573:221-229.
- Curto-Reyes V, Juarez L, Garcia-Perez E, Fresno MF, Hidalgo A, Menendez L, Baamonde A. (2008) Local loperamide inhibits thermal hyperalgesia but not mechanical allodynia induced by intratibial inoculation of melanoma cells in mice. *Cell Mol Neurobiol* 28:981-990.
- Czeschik JC, Hagenacker T, Schäfers M, Büsselberg D (2008) TNFalpha differentially modulates ion channels of nociceptive neurons. *Neurosci Lett* 434:293-298.
- D'Amore FE, Smith DL. (1941) A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72:74-79.

- D'Mello R, Dickenson AH. (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *Brit J Anaesth* 101: 8-16.
- Dagenais C, Rousselle C, Pollack GM, Scherrmann JM. (2000) Development of an in situ mouse brain perfusion model and its application to mdr1a P-glycoprotein-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:381-386.
- Dai S, Hall DD, Hell JW. (2009) Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiol Rev* 89:411-452.
- Dennis SG, Melzack R, Gutman S, Boucher F. (1980) Pain modulation by adrenergic agents and morphine as measured by three pain tests. *Life Sci* 26:1247-1259.
- Ding YQ, Nomura S, Kaneko T, Mizuno N. (1995) Co-localization of mu-opioid receptor-like and substance P-like immunoreactivities in axon terminals within the superficial layers of the medullary and spinal dorsal horns of the rat. *Neurosci Lett* 198:45-48.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Dougherty PM, Cata JP, Burton AW, Vu K, Weng HR. (2007) Dysfunction in multiple primary afferent fiber subtypes revealed by quantitative sensory testing in patients with chronic vincristine-induced pain. *J Pain Symptom Manage* 33:166-179.
- Dumont M, Lemaire S. (1998) Characterization of the high affinity [³H]nociceptin binding site in membrane preparations of rat heart: correlations with the non-opioid dynorphin binding site. *J Mol Cell Cardiol* 30:2751-2760.
- Egleton RD, Abbruscato TJ, Thomas SA, Davis TP. (1998). Transport of opioid peptides into the central nervous system. *J Pharm Sci* 87:1433-1439.
- Eisenberg E, Vos BP, Strassman AM. (1993) The NMDA antagonist memantine blocks pain behavior in a rat model of formalin-induced facial pain. *Pain* 54:301-307.
- Eisinger DA i Ammer H. (2008) Delta-opioid receptors activate ERK/MAP kinase via integrin-stimulated receptor tyrosine kinases. *Cell Signal* 20:2324-2331.
- Elliott K, Hynansky A, Inturrisi CE. (1994) Dextromethorphan attenuates and reverses analgesic tolerance to morphine. *Pain* 59:361-368.
- Evans CJ, Keith DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258:1952-1955.
- Faith RE, Liang HJ. Murgu AJ, Plotnikoff NP. (1984) Neuroimmunomodulation with enkephalins: Enhancement in human natural killer (NK) cell activity in vitro. *Clin Immunol Immunopathol* 31:412-418.

Faith RE, Murgu AJ. (1988) Inhibition of pulmonary metastases and enhancement of natural killer cell activity by methionine-enkephalin. *Brain Behav Immun* 2:114-122.

Farquhar-Smith P. (2011) Chemotherapy-induced neuropathic pain. *Curr Opin Support Palliat Care* 5:1-7.

Farrington EA, McGuinness GA, Johnson GF, Erenberg A, Leff RD. (1993) Continuous intravenous morphine infusion in postoperative newborn infants. *Am J Perinatol* 10:84-87.

Faura CC, Olaso MJ, Cabanes GC, Horga JF.(1996) Lack of morphine-6-glucuronide antinociception after morphine treatment. Is morphine-3-glucuronide involved? *Pain* 65:25-30.

Feng YP, Yang K, Li YQ.(2001) Analgesic mechanisms of noradrenaline in the spinal dorsal horn. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 33:225-228.

Feng B, Li Z, Wang JB. (2011) Protein kinase C-mediated phosphorylation of the μ -opioid receptor and its effects on receptor signaling. *Mol Pharmacol* 79:768-775.

Fields HL, Vanegas H, Hentall ID, Zorman G. (1983) Evidence that disinhibition of brain stem neurones contributes to morphine analgesia. *Nature* 306:684-686.

Fisch MJ, Lee JW, Weiss M, Wagner LI, Chang VT, Cella D, Manola JB, Minasian LM, McCaskill-Stevens W, Mendoza TR, Cleeland CS. Prospective, observational study of pain and analgesic prescribing in medical oncology outpatients with breast, colorectal, lung, or prostate cancer. *J Clin Oncol* 30:1980-1988.

Flippen-Anderson JL, Deschamps JR, George C, Hruby VJ, Misicka A, Lipkowski AW. (2002) Crystal structure of biphalin sulfate: a multireceptor opioid peptide. *J Pept Res* 59:123-133.

Ford CP, Beckstead MJ, Williams JT. (2007) Kappa opioid inhibition of somatodendritic dopamine inhibitory postsynaptic currents. *J Neurophysiol* 97:883-891.

Ford CP, Mark GP, Williams JT. (2006) Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location. *J Neurosci* 26:2788-2797.

Friedrich AE, Gebhart GF. (2000) Effects of spinal cholecystokinin receptor antagonists on morphine antinociception in a model of visceral pain in the rat. *JPET* 292:538-544.

Fujita K, Ando Y, Yamamoto W, Miya T, Endo H, Sunakawa Y, Araki K, Kodama K, Nagashima F, Ichikawa W, Narabayashi M, Akiyama Y, Kawara K, Shiomi M, Ogata H, Iwasa H, Okazaki Y, Hirose T, Sasaki Y. (2010) Association of UGT2B7 and ABCB1 genotypes with morphine-induced adverse drug reactions in Japanese patients with cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 65:251-258.

- Fukuda K, Kato Mori SK, Hishi M, Takeshima H. (1993) Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor delta- and mu-subtypes. *FEBS Lett* 327:311-314.
- Fukunaga H, Takahashi M, Kaneto H, Yoshikawa M. (1999) Effects of Tyr-MIF-1 on stress-induced analgesia and the blockade of development of morphine tolerance by stress in mice. *Jpn J Pharmacol* 79:231-235.
- Furst S. (1999) Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull* 48: 129-41.
- Gannon RL, Terrian DM. (1992) Kappa opioid agonists inhibit transmitter release from guinea pig hippocampal mossy fiber synaptosomes. *Neurochem Res* 17:741-747.
- Gao L, Smith RS, Chen LM, Chai KX, Chao L, Chao J. (2010) Tissue kallikrein promotes prostate cancer cell migration and invasion via a protease-activated receptor-1-dependent signaling pathway. *Biol Chem* 391:803-812.
- Gao YJ, Cheng JK, Zeng Q, Xu ZZ, Decosterd I, Xu X, Ji RR. (2009) Selective inhibition of JNK with a peptide inhibitor attenuates pain hypersensitivity and tumor growth in a mouse skin cancer pain model. *Exp Neurol* 219:146-155.
- Garry MG, Hargreaves KM. (1992) Enhanced release of immunoreactive CGRP and substance P from spinal dorsal horn slices occurs during carrageenan inflammation. *Brain Res* 582:139-142.
- Gauchan P, Andoh T, Ikeda K, Fujita M, Sasaki A, Kato A, Kuraishi Y. (2009) Mechanical allodynia induced by paclitaxel, oxaliplatin and vincristine: different effectiveness of gabapentin and different expression of voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta-1 subunit. *Biol Pharm Bull* 32:732-734.
- Gaveriaux-Ruff C, Simonin F, Filliol D, Kieffer BL. (2003) Enhanced humoral response in kappa-opioid receptor knockout mice. *J Neuroimmunol* 134:72-81.
- Gazyakan E, Hennegriff M, Haaf A, Landwehrmeyer GB, Feuerstein TJ, Jackisch R. (2000) Characterization of opioid receptor types modulating acetylcholine release in septal regions of the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:32-40.
- Gebhart GF. (2004) Descending modulation of pain. *Neurosci Biobehav R* 27:729-737.
- Ghazarossian VE, Chavkin C, Goldstein A. (1980) A specific radioimmunoassay for the novel opioid peptide dynorphin. *Life Sci* 27:75-86.

Gikas PD, Hanna SA, Aston W, Kalson NS, Tirabosco R, Saifuddin A, Cannon SR. (2008) Post-radiation sciatic neuropathy: a case report and review of the literature. *World J Surg Oncol* 6:130.

Gilbert PE, Martin WR. (1976) The effects of morphine- and naltorphine-like drugs in the nondependent morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 197:517-532.

Godar DE. (2011) Worldwide increasing incidences of cutaneous malignant melanoma. *J Skin Cancer* 858425.

Goldstein A, Ghazarossian VE. (1980) Immunoreactive dynorphin in pituitary and brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6207-6210.

Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L. (1979) Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide (endorphin/[Leu]enkephalin/pituitary/neuropeptide/endogenous morphine-like peptide). *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6666-6670.

Gomber S, Dewan P, Chhonker D. (2010) Vincristine induced neurotoxicity in cancer patients. *Indian J Pediatr* 77:97-100.

Gong Q-L, Hedner J, Björkman R, Hedner T. (1992) Morphine-3-glucuronide may functionally antagonize morphine-6-glucuronide induced antinociception and ventilatory depression in the rat. *Pain* 48:249-255.

Granados-Soto V, Kalcheva I, Hua X, Newton A, Yaksh TL. (2000) Spinal PKC activity and expression: role in tolerance produced by continuous spinal morphine infusion. *Pain* 85:395-404.

Gray AC, White PJ and Coupar IM. (2005) Characterisation of opioid receptors involved in modulating circular and longitudinal muscle contraction in the rat ileum. *Br J Pharmacol* 144:687-694.

Grisel JE, Mogil JS, Belknap JK, Grandy DK. (1996) Orphanin FQ acts as a supraspinal, but not a spinal, anti-opioid peptide. *Neuroreport* 7:2125-2129.

Grond S, Zeck D, Diefenbach C, Radbruch L, Lehmann KA. (1996) Assessment of cancer pain: a prospective evaluation in 2266 cancer patients referred to a pain service. *Pain* 64:107-114.

Guastella V, Mick G, Soriano C, Vallet L, Escande G, Dubray C, Eschalier A. (2011) A prospective study of neuropathic pain induced by thoracotomy: incidence, clinical description, and diagnosis. *Pain* 152:74-81.

- Gupta A, Decailot FM, Devi LA. (2006) Targeting opioid receptor heterodimers: strategies for screening and drug development. *AAPS J* 8:E153-E159.
- Gupta K, Kshirsagar S, Chang L, Schwartz R, Law PY, Yee D, Hebbel RP. (2002) Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth. *Cancer Res* 62:4491-4498.
- Hanna MH, Peat SJ, Knibb AA, Fung C. (1991) Disposition of morphine-6-glucuronide and morphine in healthy volunteers. *Br J Anaesth* 66:103-107.
- Hao JX, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ. (1997) Lack of cross-tolerance between the antinociceptive effect of intrathecal orphanin FQ and morphine in the rat. *Neurosci Lett* 223:49-52.
- Hao S, Mata M, Goins W, Glorioso JC, Fink DJ. (2003) Transgene-mediated enkephalin release enhances the effect of morphine and evades tolerance to produce a sustained antiallodynic effect in neuropathic pain. *Pain* 102:135-142.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77-88.
- Hasselström J i Säwe J. (1993) Morphine pharmacokinetics and metabolism in humans. *Clin Pharmacokinet* 24:344-354.
- Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Castanas E. (1996) The antiproliferative effect of opioid receptor agonists on the T47D human breast cancer cell line, is partially mediated through opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 296:199-207.
- Hayashi T, Tsao LI, Su TP. (2002) Antiapoptotic and cytotoxic properties of delta opioid peptide [D-Ala(2),D-Leu(5)]enkephalin in PC12 cells. *Synapse* 43:86-94.
- He L, Kim J, Ou C, McFadden W, van Rijn RM, Whistler JL (2009) Methadone antinociception is dependent on peripheral opioid receptors. *J Pain* 10:369-379.
- Heinricher MM, McGaraughty S, Grandy DK. (1997) Circuitry underlying antiopioid actions of orphanin FQ in the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 78:3351-3358.
- Heinricher MM, Morgan MM, Fields HL. (1992) Direct and indirect actions of morphine on medullary neurons that modulate nociception. *Neurosci* 48:533-543.
- Heiskanen T, Matzke S, Haakana S, Gergov M, Vuori E, Kalso E. (2009) Transdermal fentanyl in cachectic cancer patients. *Pain* 144:218-22.

Hemstapat K, Monteith G, Smith D, Smith M. (2003) Morphine-3-glucuronide's neuro-excitatory effects are mediated by indirect activation of NMDA receptors: mechanistic studies in embryonic cultured hippocampal neurones. *Anesth Analg* 97:494-505.

Hennies MH, Friderichs E, Schneider J. (1988) Receptor binding, analgesic and antitussive potency of tramadol and other selected opioids. *Arzneimittel-Forsch* 38:877-880.

Henry DJ, Grandy DK, Lester HA, Davidson N, Chavkin C. (1995). kappa-opioid receptors couple to inwardly rectifying potassium channels when coexpressed by *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 47:551-557.

Hermanussen S, Do M, Cabot PJ. (2004) Reduction of beta-endorphin-containing immune cells in inflamed paw tissue corresponds with a reduction in immune-derived antinociception: reversible by donor activated lymphocytes. *Anesth Analg* 98:723-729.

Herrero JF, Laird JM, Lopez-García JA. (2000) Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol* 61:169-203.

Herz A. (1998) Opioid reward mechanisms: a key role in drug abuse? *Can J Physiol Pharmacol* 76:252-258.

Hickey OT, Nugent NF, Burke SM, Hafeez P, Mudrakouski AL, Shorten GD. (2011) Persistent pain after mastectomy with reconstruction. *J Clin Anesth* 23:482-488.

Hilgier M, Jarosz J, Luczak J, Lemieszek A, Leppert W. (2004) Leczenie bólów nowotworowych - standardy i wytyczne. *Terapia* 12:49-60.

Hirata H, Sonoda S, Agui S, Yoshida M, Ohinata K, Yoshikawa M. (2007) Rubiscolin-6 a delta opioid peptide derived from spinach Rubisco, has anxiolytic effect via activating sigma1 and dopamine D1 receptors. *Peptides* 28:1998-2003.

Hirokami M, Togashi H, Matsumoto M, Yoshioka M, Saito H. (1994) The functional role of opioid receptors in acetylcholine release in the rat adrenal medulla. *Eur J Pharmacol* 253:9-15.

Holzer P. (2004) Opioids and opioid receptors in the enteric nervous system: from a problem in opioid analgesia to a possible new prokinetic therapy in humans. *Neurosci Lett*. 361:192-195.

Hoogerwerf WA, Zou L, Shenoy M, Sun D, Micci MA, Lee-Hellmich H, Xiao SY, Winston JH, Pasricha PJ. (2001) The proteinase-activated receptor 2 is involved in nociception. *J Neurosci* 21:9036-9042.

Horan PJ, Mattia A, Bilsky EJ, Weber S, Davis TP, Yamamura HI, Malatynska E, Appleyard SM, Slaninova J, Misicka A. (1993) Antinociceptive profile of biphalin, a dimeric enkephalin analog. *J Pharmacol Exp Ther* 265:1446-1454.

Horan PJ, Mattia A, Bilsky EJ, Weber S, Davis TP, Yamamura HI, Malatynska E, Appleyard SM, Slaninova J, Misicka A. (1993) Antinociceptive profile of biphalin, a dimeric enkephalin analog. *J Pharmacol Exp Ther* 265:1446-1454.

Horvat S, Kralj M, Perc M, Jeric I, Varga-Defterdarovic L, Jakas A, Roscic M, Suman L, Gredicak M. (2009) Novel side-chain glucosylated and adamantylated [Asp(2)/Glu(2)]enkephalin analogs: synthesis and in vitro growth inhibition of human tumor cells. *Chem Biol Drug Des* 73:253-257.

Hou L, Li W, Wang X. (2003) Mechanism of interleukin-1 beta-induced calcitonin gene-related peptide production from dorsal root ganglion neurons of neonatal rats. *J Neurosci Res* 73:188-197.

Hucklebridge FH, Hudspith BN, Lydyard PM, Brostoff J. (1990) Stimulation of human peripheral lymphocytes by methionine enkephalin and delta-selective opioid analogues. *Immunopharmacol* 19:87-91.

Hughes J, Smith T, Morgan B, Fothergill L. (1975) Purification and properties of enkephalin - the possible endogenous ligand for the morphine receptor. *Life Sci* 16:1753-1758.

Hurlbut DE, Evans CJ, Barchas JD, Leslie FM. (1987) Pharmacological properties of a proenkephalin A-derived opioid peptide: BAM 18. *Eur J Pharmacol* 138:359-366.

Hylden JL, Wilcox GL. (1981) Intrathecal substance P elicits a caudally-directed biting and scratching behavior in mice. *Brain Res* 217:212-215.

Innis RB, Snyder SH. (1980) Distinct cholecystinin receptors in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6917-6921.

Inoue A, Ikoma K, Morioka N, Kumagai K, Hashimoto T, Hide I, Nakata Y. (1999) Interleukin-1beta induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. *J Neurochem* 73:2206-2213.

International Association for the Study of Pain. (1986) Classification of chronic pain. *Pain* 3:1-226.

Inturrisi CE. (2002) Clinical pharmacology of opioids for pain. *Clin J Pain* 18:3-13.

Irwin S, Houde RW, Bennett DR, Hendershot LC, Seevers MH. (1951) The effects of morphine, methadone and meperidine on some reflex responses of spinal animals to nociceptive stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 101:132-143.

- Jackisch R, Geppert M, Illes P. (1986) Characterization of opioid receptors modulating noradrenaline release in the hippocampus of the rabbit. *J Neurochem* 46:1802-1810.
- Jenkins AJ. (2008) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of abused drugs. CRC Press 25-63.
- Jensen TS, Yaksh TL (1986) Comparison of antinociceptive action of morphine in the periaqueductal gray, medial and paramedial medulla in the rat. *Brain Res* 363:99–113.
- Jessop DS, Fassold A, Wolff C, Hofbauer R, Chover-Gonzalez A, Richards LJ, Straub RH. (2010) Endomorphins in rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and experimental arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1193:117-122.
- Jiang ZG, North RA. (1992) Pre- and postsynaptic inhibition by opioids in rat striatum. *J Neurosci* 12:356-361.
- Jin W, Lee NM, Loh HH, Thayer SA.(1992) Dual excitatory and inhibitory effects of opioids on intracellular calcium in neuroblastoma 2 glioma hybrid NG108-15 cells. *Mol Pharmacol* 42:1083-89.
- Johnson PS, Wang JB, Wang WF, Uhl GR. (1994). Expressed mu opiate receptor couples to adenylate cyclase and phosphatidyl inositol turnover. *NeuroReport* 5:507-509.
- Joshi S, Lee JW, Wong YH. (1999) Stimulation of phospholipase C by the cloned mu, delta and kappa opioid receptors via chimeric G alpha(q) mutants. *Eur J Neurosci* 11:383-388.
- Juni A, Klein G, Kest B. (2006) Morphine hyperalgesia in mice is unrelated to opioid activity, analgesia, or tolerance: evidence for multiple diverse hyperalgesic systems. *Brain Res* 1070:35-44.
- Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda M, Morimoto Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Nakanishi S, Numa S. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature* 298:245-249.
- Kalb RG, Fox AJ. (1997) Synchronized overproduction of AMPA, kainate, and NMDA glutamate receptors during human spinal cord development. *J Comp Neurol* 384:200-210.
- Kampa M, Bakogeorgou E, Hatzoglou A, Damianaki A, Martin PM, Castanas E. (1997) Opioid alkaloids and casomorphin peptides decrease the proliferation of prostatic cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU145) through a partial interaction with opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 335:255-265.

Kanemitsu Y, Hosoi M, Zhu PJ, Weight FF, Peoples RW, McLaughlin JS, Zhang L. (2003) Dynorphin A inhibits NMDA receptors through a pH-dependent mechanism. *Mol Cell Neurosci* 24:525-537.

Kawalec M, Kowalczyk JE, Beresewicz M, Lipkowski AW, Zablocka B. (2011) Neuroprotective potential of biphalin, multireceptor opioid peptide, against excitotoxic injury in hippocampal organotypic culture. *Neurochem Res* 36:2091-2095.

Kearns IR, Morton RA, Bulters DO, Davies CH. (2001) Opioid receptor regulation of muscarinic acetylcholine receptor-mediated synaptic responses in the hippocampus. *Neuropharmacology* 41:565-573.

Kenakin T. (2002) Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Drug Discov* 1:103-110.

Keniston L, Mao J, Price DD, Lu J, Mayer DJ. (1998) Evidence for co-localization of mu-opioid and NMDA receptors in spinal cord dorsal horn neurons of the rat. *Soc Neurosci Abstr* 24:390.

Khachaturian H, Lewis ME, Alessi NE, Watson SJ. (1985) Time of origin of opioid peptide-containing neurons in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 236:538-546.

Khalefa BI, Shaqura M, Al-Khrasani M, Furst S, Mousa SA, Schäfer M. (2012) Relative contributions of peripheral versus supraspinal or spinal opioid receptors to the antinociception of systemic opioids. *Eur J Pain* 16:690-705.

Khurshid N, Hameed LS, Mohanasundaram S, Iyengar S. (2010) Opioid modulation of cell proliferation in the ventricular zone of adult zebra finches (*Taenopygia guttata*). *FASEB J* 24:3681-3695.

Kim SH, Chung JM. (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-363.

Klepstad P, Kaasa S, Borchgrevink PC. (2000) Start of oral morphine to cancer patients: effective serum morphine concentrations and contribution from morphine-6-glucuronide to the analgesia produced by morphine. *Eur J Clin Pharmacol* 55:713-719.

Kline RH 4th, Wiley RG. (2008) Spinal mu-opioid receptor-expressing dorsal horn neurons: role in nociception and morphine antinociception. *J Neurosci* 28:904-913.

Kobilka BK, Deupi X. (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28:397-406.

Kolokythas A, Cox DP, Dekker N, Schmidt BL. (2010) Nerve growth factor (NGF) and tyrosine kinase A (Trk A) receptor in oral squamous cell carcinoma: is there an association with perineural invasion? *J. Oral Maxillofacial Surg* 68:1290-1295.

- Kondo I, Marvizon JC, Song B, Salgado F, Codeluppi S, Hua XY, Yaksh TL. (2005) Inhibition by spinal mu- and delta-opioid agonists of afferent-evoked substance P release. *J Neurosci* 25:3651-3660.
- Koski G i Klee WA. (1981) Opiates inhibit adenylate cyclase by stimulating GTP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4185-4189.
- Kosson D, Bonney I, Carr DB, Mayzner-Zawadzka E, Lipkowski AW. (2005) Antinociception after intrathecal biphalin application in rats: a reevaluation and novel, rapid method to confirm correct catheter tip position. *Pharmacol Rep* 57:545-549.
- Kosson D, Klinowiecka A, Kosson P, Bonney I, Carr DB, Mayzner-Zawadzka E, Lipkowski AW. (2008) Intrathecal antinociceptive interaction between the NMDA antagonist ketamine and the opioids, morphine and biphalin. *Eur J Pain* 12:611-616.
- Kotlinska-Lemieszek A, Baczyk E, Łuczak J. (1999) Podstawy patofizjologii i diagnostyki bólów nowotworowych. Zespoły bólowe najczęściej występujące u pacjentów w zaawansowanym okresie choroby nowotworowej. Nowa Medycyna
- Kream RM, Kato T, Shimonaka H, Marchand JE, Wurm WH. (1993) Substance P markedly potentiates the antinociceptive effects of morphine sulfate administered at the spinal level. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3564-3568.
- Krupnick JG, Benovic JL. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:289-319.
- Kurrikoff K, Koks S, Matsui T, Bourin M, Arend A, Aunapuu M, Vasar E. (2004) Deletion of the CCK2 receptor gene reduces mechanical sensitivity and abolishes the development of hyperalgesia in mononeuropathic mice. *Eur J Neurosci* 20:1577-1586.
- Labuz D, Mousa SA, Schafer M, Stein C, Machelska H. (2007) Relative contribution of peripheral versus central opioid receptors to antinociception. *Brain Res* 1160:30-38.
- Law PY, Wong YH, Loh HH. (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signalling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:389-430.
- Lazarczyk M, Matyja E, Lipkowski AW. (2010) A comparative study of morphine stimulation and biphalin inhibition of human glioblastoma T98G cell proliferation in vitro. *Peptides* 31:1606-1612.
- Le Greves P, Nyberg F, Terenius L, Hokfelt T. (1985) Calcitonin gene-related peptide is a potent inhibitor of substance P degradation. *Eur J Pharmacol* 115:309-311.
- Leach BC, Kulbersh JS, Day TA, Cook J. (2008). Cranial neuropathy as a presenting sign of recurrent aggressive skin cancer. *Dermatol Surg* 34:483-497.

- Lehembre S, Carvalho P, Young P, Josset V, Hacpille L, Joly P. (2006) Palliative care management of patients in a dermatology department. *Ann Dermatol Venereol* 133:967-970.
- Lehner M, Wislowska-Stanek A, Maciejak P, Szyndler J, Sobolewska A, Krzascik P, Plaznik A. (2010) The relationship between pain sensitivity and conditioned fear response in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 70:56-66.
- Leo S, Nuydens R, Meert TF. (2009) Opioid-induced proliferation of vascular endothelial cells. *J Pain Res* 2:59–66.
- Leppert W, Łuczak J. (2001) Ocena przydatności analgetycznej i objawów ubocznych morfiny w leczeniu bólu przewlekłego. *Bol* 2:27-33.
- Leppert W, Luczak J. (2002) Rola tramadolu w leczeniu bólu nowotorowego. *Pol Med Paliat* 1:93-105.
- Leppert W. (2009) Tramadol as an analgesic for mild to moderate cancer pain. *Pharmacol Rep* 61:978-992.
- Levac B, O'Dowdand BF, George SR. (2002) Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units. *Curr Opin Pharmacol* 2:76-81.
- Lewin GR, Moshourab R. (2004) Mechanosensation and pain. *J Neurobiol* 61:30-44.
- Li CH, Chung D. (1976) Isolation and structure of an untrikontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1145-1148.
- Li JL, Ding YQ, Li YQ, Li JS, Nomura S, Kaneko T, Mizuno N. (1998) Immunocytochemical localization of μ -opioid receptor in primary afferent neurons containing substance P or calcitonin gene-related peptide. A light and electron microscope study in the rat. *Brain Res* 794:347-352.
- Li LY i Chang KJ. (1996) The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express μ -opioid receptors. *Mol Pharmacol* 50:599-602.
- Li S, Zhu J, Chen G, Chen YW, Deriel JK, Ashby B, Liu-Chen LY. (1993) Molecular cloning and expression of a rat κ opioid receptor. *Biochem J* 295:629-633.
- Li Z, Proud D, Zhang C, Wiehler S, McDougall JJ. (2005) Chronic arthritis down-regulates peripheral μ -opioid receptor expression with concomitant loss of endomorphin 1 antinociception. *Arthritis Rheum* 52:3210-3219.

- Light AR i Perl ER. (1993) Peripheral sensory systems, in: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW Low PA, Poduslo JF (Eds.). *Peripheral Neuropathy*, W.B. Saunders, Philadelphia, 1993, pp. 149-165.
- Lin X, Yang DJ, Cai WQ, Zhao QY, Gao YF, Chen Q, Wang R. (2003) Endomorphins, endogenous opioid peptides provide antioxidant defense in the brain against free radical-induced damage. *Biochim Biophys Acta* 1639:195:202.
- Lipkowski AW, Konecka AM, Sroczyńska I, Przewlocki R, Stala L, Tam SW. (1987) Bivalent opioid peptide analogues with reduced distances between pharmacophores. *Life Sci* 40:2283-2288.
- Lipkowski AW, Konecka AM, Sroczyńska I. (1982) Double-enkephalins-synthesis, activity on guinea-pig ileum, and analgesic effect. *Peptides* 3:697–700.
- Lipkowski AW, Misicka A, Davis P, Stropova D, Janders J, Lachwa M, Porreca F, Yamamura HI, Hruby VJ. (1999) Biological activity of fragments and analogues of the potent dimeric opioid peptide-biphalin. *Bioorgan Med Chem* 9:2763-2766.
- Lipkowski AW. (1987) Cooperative reinforcement of opioid pharmacophores. *Pol J Pharmacol Pharm* 39: 585-596.
- Liu JG, Ruckle MG, Prather PL. (2001) Constitutively Active mu-Opioid Receptors Inhibit Adenylyl Cyclase Activity in Intact Cells and Activate G-proteins Differently than the Agonist [D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly-ol⁵]Enkephalin 276:37779-37786.
- Lofgren O, Yu LC, Theodorsson E, Hansson P, Lundeberg T. (1998) Opioids modulate the calcitonin gene-related peptide 8-37-mediated hindpaw withdrawal latency increase in thermally injured rats. *Neuropeptides* 32:173-177.
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267:495-499.
- Lotsch J i Geisslinger G. (2001) Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin Pharmacokinet* 40:485-499.
- Lu CY, Chou AK, Wu CL, Yang CH, Chen JT, Wu PC, Lin SH, Muhammad R, Yang LC. (2002) Gene-gun particle with pro-opiomelanocortin cDNA produces analgesia against formalin-induced pain in rats. *Gene Ther* 9:1008-1014.
- Lu Y, Perl ER. (2007) Selective action of noradrenaline and serotonin on neurones of the spinal superficial dorsal horn in the rat. *J Physiol*. 582:127-136.
- Lussier D. Huskey G, Portenoy RK. (2004) Adjuvant analgesics in cancer pain management *The Oncologist* 9:571-591.

Ma GH, Miller RJ, Kuznetsov A, Philipson LH. (1995) kappa-Opioid receptor activates an inwardly rectifying K⁺ channel by a G protein-linked mechanism: coexpression in *Xenopus oocytes*. *Mol Pharmacol* 47:1035-1040.

Ma J, Jiang Y, Jiang Y, Sun Y, Zhao X. (2008) Expression of nerve growth factor and tyrosine kinase receptor A and correlation with perineural invasion in pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 23:1852-1859.

Makman MH, Dvorkin B. (1997) Presence of nociceptin (orphanin FQ) receptors in rat retina: comparison with receptors in striatum. *Eur J Pharmacol* 338:171-176.

Maksymowicz M, Kosson D, Lipkowski AW, Olszewski WL. (2000) Influence of opioids on lymphocyte circulation and homing. *Transplant Proc* 32:1395-1396.

Malan TP Jr, Marsh G, Hakki SI, Grossman E, Traylor L, Hubbard RC. (2003) Parecoxib sodium, a parenteral cyclooxygenase 2 selective inhibitor, improves morphine analgesia and is opioid-sparing following total hip arthroplasty. *Anesthesiology* 98:950-956.

Malcangio M, Bowery NG. (1993) GABA_B, but not GABA_A receptor activation, inhibits electrically evoked substance P-like immunoreactivity release from the rat spinal cord in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 266:1490-1496.

Manfredi PL, Gonzales GR, Sady R, Chandler S, Payne R. (2003) Neuropathic pain in patients with cancer. *J Palliat Care* 19:115-118.

Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. (1988). Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci* 11:308-314.

Mao J, Price DD, Phillips LL, Lu J, Mayer DJ. (1995) Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord of rats associated with tolerance to the analgesic effects of morphine. *Brain Res* 677:257-267.

Marker CL, Lujan R, Loh HH, Wickman K. (2005) Spinal G-Protein-Gated Potassium Channels Contribute in a Dose-Dependent Manner to the Analgesic Effect of mu- and delta- But Not kappa-Opioids. *J Neurosci* 25:3551-3559.

Markopoulos CJ, Spyropoulou AC, Zervas IM, Christodoulou GN, Papageorgiou C. (2010) Phantom breast syndrome: The effect of in situ breast carcinoma. *Psychiatry Res* 179:333-337.

Martin-Schild S, Gerall AE, Kastin AJ, Zadina JE. (1998) Endomorphin-2 is an endogenous opioid in primary sensory afferent fibers. *Peptides* 19:1783-1789.

Mayer DJ, Hayes RL. (1975) Stimulation-produced analgesia: development of tolerance and cross-tolerance to morphine. *Science* 188:941-943.

- Mayer DJ, Wolfle T, Akil H, Carder B, Liebeskind JC. (1971) Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. *Science* 174:1351-1354.
- McDougall A, Dampney R, Bandler R. (1985) Cardiovascular components of the defence reaction evoked by excitation of neuronal cell bodies in the midbrain periaqueductal grey of the cat. *Neurosci Lett* 60:69-75.
- Mehrotra S, Prajapati RK, Haq W, Singh VK. (2002) Immunomodulation by biphalin, dimeric synthetic opioid peptide, and its analog. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 24:83-96.
- Melzack K, Wall PD. (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979.
- Menendez L, Lastra A, Fresno MF, Llamas S, Meana A, Hidalgo A, Baamonde A. (2003) Initial thermal heat hypoalgesia and delayed hyperalgesia in a murine model of bone cancer pain. *Brain Res* 969:102-109.
- Menendez L, Lastra A, Hidalgo A, Meana A, Garcia E, Baamonde A. (2003) Peripheral opioids act as analgesics in bone cancer pain in mice. *Neuroreport* 14:867-869.
- Menendez L, Lastra A, Meana A, Hidalgo A, Baamonde A. (2005) Analgesic effects of loperamide in bone cancer pain in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 81:114-121.
- Meng F, Xie GX, Thompson RC, Mansour A, Goldstein A, Watson SJ, Akil H. (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9954-9958.
- Mercadante S, Casuccio A, Agnello A, Pumo S, Kargar J, Garofalo S. (1999) Analgesic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cancer pain due to somatic or visceral mechanisms. *J Pain Symptom Manage* 17:351-356.
- Mercadante S, Radbruch L, Caraceni A, Cherny N, Kaasa S, Nauck F, Ripamonti C, De Conno F. Episodic (breakthrough) pain: consensus conference of an expert working group of the European Association for Palliative Care. *Cancer* 94:832-839.
- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, Mazarguil H, Vassart G, Parmentier M, Costentin J. (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377:532-535.
- Mielke S, Sparreboom A, Mross K. (2006) Peripheral neuropathy: a persisting challenge in paclitaxel-based regimes. *Eur J Cancer* 42:24-30.
- Mikus G, von Richter O, Hofmann U. (1999) Glucuronidation of morphine in human liver and small intestine. *Book of Abstracts, 9th World Congress on Pain. Vienna, 335.*

Miyagi T, Chuang LF, Lam KM, Kung H, Wang JM, Osburn BI, Chuang RY. (2000) Opioids suppress chemokine-mediated migration of monkey neutrophils and monocytes - an instant response. *Immunopharmacol* 47:53-62.

Mizuno K, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. (1980) A new family of endogenous "big" Met-enkephalins from bovine adrenal medulla: purification and structure of docosa- (BAM-22P) and eicosapeptide (BAM-20P) with very potent opiate activity. *Biochem Biophys Res Commun* 97:1283-1290.

Mogil JS, Grisel JE, Reinscheid RK, Civelli O, Belknap JK, Grandy DK. (1996) Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neurosci* 75:333-337.

Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC. (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341:33-38.

Mollica A, Davis P, Ma SW, Lai J, Porreca F, Hruby VJ. (2005) Synthesis and biological evaluation of new biphalin analogues with non-hydrazine linkers. *Bioorg Med Chem Lett* 15:2471-2475.

Morgan MM, Heinricher MM, Fields HL. (1992) Circuitry linking opioid-sensitive nociceptive modulatory systems in periaqueductal gray and spinal cord with rostral ventromedial medulla. *Neurosci* 47:863-871.

Mosberg HI, Omnaas JR, Goldstein A. (1987) Structural requirements for delta opioid receptor binding. *Mol Pharmacol* 31:599-602.

Moulin DE, Max MB, Kaiko RF, Inturrisi CE, Maggard J, Yaksh TL, Foley KM. (1985) The analgesic efficacy of intrathecal D-Ala²-D-Leu⁵-enkephalin in cancer patients with chronic pain. *Pain* 23:213-221.

Mousa SA, Shakibaei M, Sitte N, Schafer M, Stein C. (2004) Subcellular pathways of β -endorphin synthesis, processing and release from immunocytes in inflammatory pain. *Endocrinology* 145:1331-1341.

Mucha RF, Kalant H, Birbaumer N. (1996) Loss of tolerance to morphine after a change in route of administration: control of within-session tolerance by interoceptive conditioned stimuli. *Psychopharmacol (Berl)*. 124:365-372.

Murgo AJ. (1985) Inhibition of B16-BL6 melanoma growth in mice by methionine-enkephalin. *J Natl Cancer Inst* 75:341-344.

Murphy PG, Ramer MS, Borthwick L, Gauldie J, Richardson PM, Bisby MA. (1999) Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice. *Eur J Neurosci* 11:2243-2253.

Narita M, Kuzumaki N, Miyatake M, Sato F, Wachi H, Seyama Y, Suzuki T. (2006) Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J Neurochem* 97:1494-1505.

Neal CR Jr, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Akil H, Watson SJ Jr. (1999) Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: comparison of ORL1 receptor mRNA expression with (125)I-[(14)Tyr]-orphanin FQ binding. *J Comp Neurol* 412:563-605.

Negin BP, Riedel E, Oliveria SA, Berwick M, Coit DG, Brady MS. (2003) Symptoms and signs of primary melanoma: important indicators of Breslow depth. *Cancer* 98:344-348.

Nichols ML, Lopez Y, Ossipov MH, Bian D, Porreca F. (1997) Enhancement of the antiallodynic and antinociceptive efficacy of spinal morphine by antisera to dynorphin A (1-13) or MK-801 in a nerve-ligation model of peripheral neuropathy. *Pain* 69:317-322.

Nielsen OS, Munro AJ, Tannock IF. (1991) Bone metastases: pathophysiology and management policy. *J Clin Oncol* 9:509-524.

Nothacker HP, Reinscheid RK, Mansour A, Henningsen RA, Ardati A, Monsma FJ Jr, Watson SJ, Civelli O. (1996) Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8677-8682.

Nylund G, Pettersson A, Bengtsson C, Khorram-Manesh A, Nordgren S, Delbro DS. (2008) Functional expression of mu-opioid receptors in the human colon cancer cell line, HT-29, and their localization in human colon. *Dig Dis Sci* 53:461-466.

Obara I, Makuch W, Spetea M, Schutz J, Schmidhammer H, Przewlocki R. (2007) Local peripheral antinociceptive effects of 14-O-methyloxymorphone derivatives in inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Eur J Pharmacol* 558:60-67.

Obara I, Parkitna JR, Korostynski M, Makuch W, Kaminska D, Przewlocka B, Przewlocki R. (2009) Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. *Pain* 141:283-291.

Obara I, Przewlocki R, B Przewlocka B. (2004) Local peripheral effects of m-opioid receptor agonists in neuropathic pain in rats. *Neurosci Lett* 360:85-89.

Olofsen E, van Dorp E, Teppema L, Aarts L, Smith TW, Dahan A, Sarton E. (2010) Naloxone reversal of morphine- and morphine-6-glucuronide-induced respiratory depression in healthy volunteers: a mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling study. *Anesthesiology* 112:1417-1427.

- O'Neill MF, Dourish CT, Iversen SD. (1989) Morphine-induced analgesia in the rat paw pressure test is blocked by CCK and enhanced by the CCK antagonist MK-329. *Neuropharmacol* 28:243-247.
- Ono H, Mishima A, Ono S, Fukuda H, Vasko MR. (1991) Inhibitory effects of clonidine and tizanidine on release of substance P from slices of rat spinal cord and antagonism by α -adrenergic receptor and antagonists. *Neuropharmacology* 30:585-589.
- Ordaz-Sanchez I, Weber RJ, Rice KC, Zhang X, Rodríguez-Padilla C, Tamez-Guerra R, Mendez-Vazquez JL, Gomez-Flores R. (2003) Chemotaxis of human and rat leukocytes by the delta-selective non-peptidic opioid SNC 80. *Rev Latinoam Microbiol* 45:16-23.
- Osborne R, Joel S, Trew D, Slevin M. (1990) Morphine and metabolite behavior after different routes of morphine administration: demonstration of the importance of the active metabolite morphine-6-glucuronide. *Clin Pharmacol Ther* 47:12-19.
- Osinski MA, Pampusch MS, Murtaugh MP, Brown DR. (1999) Cloning, expression and functional role of a nociceptin/orphanin FQ receptor in the porcine gastrointestinal tract. *Eur J Pharmacol* 365:281-289.
- Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. (2010) Central modulation of pain. *J Clin Invest* 120:3779-3787.
- Otis V, Sarret P, Gendron L. (2011) Spinal activation of delta opioid receptors alleviates cancer-related bone pain. *Neurosci* 183:221-229.
- Owen M, Lorgelly P, Serpell M. (2010) Chronic pain following donor nephrectomy—a study of the incidence, nature and impact of chronic post-nephrectomy pain. *Eur J Pain*. 14:732-734.
- Pacifici GM, Bencini C, Rane A. (1986) Presystemic glucuronidation of morphine in humans and rhesus monkeys: subcellular distribution of the UDP-glucuronyltransferase in the liver and intestine. *Xenobiotica* 16:123-128.
- Pan YZ, Li DP, Chen SR, Pan HL. (2004) Activation of mu-opioid receptors excites a population of locus coeruleus-spinal neurons through presynaptic disinhibition. *Brain Res* 997:67-78.
- Pan Z, Hirakawa N, Fields HL. (2000) A cellular mechanism for the bidirectional pain-modulating actions of orphanin FQ/nociceptin. *Neuron* 26:515-522.
- Parada CA, Vivancos GG, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. (2003) Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2923-2928.

- Payne R. (2007) Recognition and diagnosis of breakthrough pain. *Pain Med* 8:3-7.
- Perl ER. (1996) Cutaneous polymodal receptors: Characteristics and plasticity. *Prog Brain Res* 113:21-37.
- Persson AI, Thorlin T, Bull C, Zarnegar P, Ekman R, Terenius L, Eriksson PS. (2003) Mu- and delta-opioid receptor antagonists decrease proliferation and increase neurogenesis in cultures of rat adult hippocampal progenitors. *Eur J Neurosci* 17:1159-1172.
- Pert CB, Snyder SH. (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179: 1011-1014.
- Petrillo P, Kowalski J, Sbacchi M, Tavani A. (1992) Characterization of opioid binding sites in rat spinal cord. *J Recept Res* 12:39-57.
- Petrovic P, Pleger B, Seymour B, Klöppel S, De Martino B, Critchley H, Dolan RJ (2008) Blocking central opiate function modulates hedonic impact and anterior cingulate response to rewards and losses. *J Neurosci* 28:10509-10516.
- Pfeiffer M, Kirscht S, Stumm R, Koch T, Wu D, Laugsch M, Schroder H, Höllt V, Schulz S. (2003) Heterodimerization of substance P and mu-opioid receptors regulates receptor trafficking and resensitization. *J Biol Chem* 278:51630-51637.
- Philippe D, Dubuquoy L, Groux H, Brun V, Chuoi-Mariot MT, Gaveriaux-Ruff C, Colombel JF, Kieffer BL, Desreumaux P. (2003) Anti-inflammatory properties of the mu opioid receptor support its use in the treatment of colon inflammation. *J Clin Invest* 111:1329-1338.
- Pil J i Tytgat J. (2003) Serine 329 of the mu-opioid receptor interacts differently with agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 304:924-930.
- Piros ET, Prather PL, Law PY, Evans CJ, Hales TG. (1996) Voltage-dependent inhibition of L-type Ca²⁺ channels in GH3cells by cloned mu- and delta-opioid receptors. *Mol. Pharmacol* 50:947-956.
- Pohl M, Ballet S, Collin E, Mauborgne A, Bourgoin S, Benoliel JJ, Hamon M, Cesselin F. (1997) Enkephalinergic and dynorphinergic neurons in the spinal cord and dorsal root ganglia of the polyarthritic rat - in vivo release and cDNA hybridization studies. *Brain Res* 749:18-28.
- Pol O, Puig MM. (2004) Expression of opioid receptors during peripheral inflammation. *Curr Top Med Chem* 4:51-61.

- Pommier B, Beslot F, Simon A, Pophillat M, Matsui T, Dauge V, Roques BP, Noble F. (2002) Deletion of CCK2 receptor in mice results in an upregulation of the endogenous opioid system. *J Neurosci* 22:2005-2011.
- Portenoy RK i Lesage P (1999) Management of cancer pain. *Lancet* 353:1695-1700.
- Portenoy RK, Payne D, Jacobsen P. (1999) Breakthrough pain: characteristics and impact in patients with cancer pain. *Pain* 1999 81:129-134.
- Przeklasa-Muszynska A, Dobrogowski J, Wordliczek J. (2006) *Terapia. CM-UJ* 11:6-10.
- Przewlocki R, Labuz D, Mika J, Przewlocka B, Tomboly C, Toth G. (1999) Pain inhibition by endomorphins. *Ann N Y Acad Sci* 897:154-164.
- Puehler W, Rittner HL, Mousa SA, Brack A, Krause H, Stein C, Schafer M. (2006) Interleukin-1 beta contributes to the upregulation of kappa opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation. *Neurosci* 141:989-998.
- Puehler W, Zollner C, Brack A, Shaqura MA, Krause H, Schafer M, Stein C. (2004) Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction. *Neurosci* 129:473-479.
- Puente J, Maturana P, Miranda D, Navarro C, Wolf ME, Mosnaim AD. (1992) Enhancement of human natural killer cell activity by opioid peptides: similar response to methionine-enkephalin and beta-endorphin. *Brain Behav Immun* 6:32-39.
- Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL. (1992) Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an "atypical" opioid analgesic. *J Pharmacol Exp Ther* 260:275-285.
- Raino J, Castiglioni AJ, Lipscombe D. (2007) Alternative splicing controls G protein-dependent inhibition of N-type calcium channels in nociceptors. *Nat Neurosci* 10:285-292.
- Ramabadran K, Bansinath M. (1986) A critical analysis of the experimental evaluation of nociceptive reactions in animals. *Pharm Res* 3:263-270.
- Raouf R, Quick K, Wood JN. (2010) Pain as a channelopathy. *J Clin Invest* 120:3745-3752.
- Rathmell JP, Lair TR, Nauman B (2005) The role of intrathecal drugs in the treatment of acute pain. *Anesth Analg* 101:30-43
- Redwine KE, Trujillo KA. (2003) Effects of NMDA receptor antagonists on acute mu-opioid analgesia in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 76:361-372.

- Reinthaller A, Riss P. (1985) Investigation of beta-endorphin and adrenocorticotrophic hormone in placenta, amniotic membrane and umbilical cord using an immunoperoxidase technique. *Gynecol Obstet Invest* 19:135-138.
- Reynolds DV. (1969) Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 164:444-445.
- Rios CD, Jordan BA, Gomes I, Devi LA. (2001) G-protein receptor dimerization: Modulation of receptor function. *Pharmacol Ther* 92:71-87.
- Rodrigues AR, Duarte ID. (2000) The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels. *Br J Pharmacol* 129:110-114.
- Rojavin M, Szabo I, Bussiere JL, Rogers TJ, Adler MW, Eisenstein TK. (1993) Morphine treatment in vitro or in vivo decreases phagocytic functions of murine macrophages. *Life Sci* 53:997-1006.
- Ronai AZ, Király K, Szebeni A, Szemenyei E, Prohászka Z, Darula Z, Toth G, Till I, Szalay B, Kato E, Barna I. (2009) Immunoreactive endomorphin 2 is generated extracellularly in rat isolated L4,5 dorsal root ganglia by DPP-IV. *Regul Pept* 157:1-2.
- Rose JB, Cuy R, Cohen DE, Schreiner MS. (1999) Preoperative oral dextromethorphan does not reduce pain or analgesic consumption in children after adenotonsillectomy. *Anesth Analg* 88:749-753.
- Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyian NS, Yanagihara R, Hirsh V, Krzakowski M, Pawlicki M, De Souza P, Zheng M, Urbanowitz G, Reitsma D, Seaman J. (2004) Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors: a randomized, Phase III, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer* 100:2613-2621.
- Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, Evans RM. (1983) Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304:129-135.
- Rossi GC, Pasternak GW, Bodnar RJ. (1994) Mu and delta opioid synergy between the periaqueductal gray and the rostro-ventral medulla. *Brain Res* 665:85-93.
- Roychowdhury SM, Fields HL. (1996) Endogenous opioids acting at a medullary mu-opioid receptor contribute to the behavioral antinociception produced by GABA antagonism in the midbrain periaqueductal gray. *Neurosci* 74:863-872.
- Saad F. (2005) Clinical benefit of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in advanced prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* 4:31-37.

- Sakai M, Fukuyama H, Sato K, Kudoh I. (2002) Effects of fentanyl on acetylcholine release from hippocampus and righting reflex in rat: an in vivo brain microdialysis study. *Masui* 51:118-123.
- Salemi S, Aeschlimann A, Reisch N, Jüngel A, Gay RE, Heppner FL, Michel BA, Gay S, Sprott H. (2005) Detection of kappa and delta opioid receptors in skin outside the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 338:1012-1017.
- Samuels SS, Schwartz SA. (1981). Compartmentation in amino acid transport across the blood brain barrier. *Neurochem Res* 6:755-765.
- Sartain JB, Mitchell SJ. (2002) Successful use of oral methadone after failure of intravenous morphine and ketamine. *Anaesth Intensive Care* 30: 487-489.
- Sasamura T, Nakamura S, Iida Y, Fujii H, Murata J, Saiki I, Nojima H, Kuraishi Y. (2002) Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. *Eur J Pharmacol* 697 441: 185-191.
- Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ. (1991) Distribution of cells containing mRNA encoding cholecystokinin in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 304:219-233.
- Schiller PW. (1991) Development of opioid peptide analogs as pharmacologic tools and as potential drugs: current status and future directions. *NIDA Res Monogr* 112:180-197.
- Schiller PW. (1993) Development of receptor-selective opioid peptide analogs as pharmacologic tools and as potential drugs. *Handb Exp Pharmacol* 104/1 (Opioids I), 681-710.
- Schmidt BL, Hamamoto DT, Simone DA, Wilcox GL. (2010) Mechanism of cancer pain. *Mol Interv* 10:164-178.
- Scholar EM, Violi L, Hexum TD. (1987) The antimetastatic activity of enkephalin-like peptides. *Cancer Lett* 35:133-138.
- Schreff M, Schulz S, Wiborny D, Holtt V. (1998) Immunofluorescent identification of endomorphin-2- containing nerve fibers and terminals in the rat brain and spinal cord. *Neuroreport* 9:1031-1034.
- Sedqi M, Roy S, Ramakrishnan S, Elde R, Loh HH. (1995) Complementary DNA cloning of a mu-opioid receptor from rat peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 209:563-574.

- Seitz S, Barvencik F, Gebauer M, Albers J, Schulze J, Streichert T, Amling M, Schinke T. (2010) Preproenkephalin (Penk) is expressed in differentiated osteoblasts, and its deletion in Hyp mice partially rescues their bone mineralization defect. *Calcif Tissue Int.* 86:282-293.
- Seizinger BR, Liebisch DC, Gramsch C, Herz A, Weber E, Evans CJ, Esch FS, Bohlen P. (1985) Isolation and structure of a novel C-terminally amidated opioid peptide, amidorphin, from bovine adrenal medulla. *Nature* 313:57-59.
- Selley DE, Breivogel CS, Childers SR. (1998) Opioid inhibition of adenylyl cyclase in membranes from pertussis toxin-treated NG108-15 cells. *J Recept Signal Transduct Res* 18:25-49.
- Seward E, Hammond C, Henderson G. (1991) Mu-opioid-receptor-mediated inhibition of the N-type calcium-channel current. *Proc Biol Sci* 244:129-135.
- Sharp BM. (2006) Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain Behav Immun* 20:9-14.
- Shimoyama M, Shimoyama N, Zhao GM, Schiller PW, Szeto HH. (2001) Antinociceptive and respiratory effects of intrathecal H-Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (DALDA) and [Dmt¹]DALDA. *J Pharmacol Exp Ther* 297:364-371.
- Shimoyama M, Szeto HH, Schiller PW, Tagaito Y, Tokairin H, Eun C, Shimoyama N. (2008) Differential Analgesic Effects of a Mu-Opioid Peptide, [Dmt¹]DALDA, and Morphine. *Pharmacol* 83: 33–37.
- Shivers BD, Harlan RE, Romano GJ, Howells RD, Pfaff DW. (1986) Cellular localization of proenkephalin mRNA in rat brain: gene expression in the caudate-putamen and cerebellar cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6221-6225.
- Siau C, Xiao W, Bennett GJ. (2006) Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. *Exp Neurol* 201:507-514.
- Silbert BS, Lipkowski AW, Cepeda MS, Szyfelbein SK, Osgood PF, Carr DB. (1991) Analgesic activity of a novel bivalent opioid peptide compared to morphine via different routes of administration. *Agents Actions* 33:382-387.
- Simon EJ, Hiller JM, Edelman I. (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic [H³]etorphine to rat brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:1947-1949.
- Sindrup SH, Andersen G, Madsen C, Smith T, Brosen K, Jensen TS. (1999) Tramadol relieves pain and allodynia in polyneuropathy: a randomised, double-blind, controlled trial. *Pain* 83:85-90.

- Slaninova J, Appleyard SM, Misicka A, Lipkowski AW, Knapp RJ, Weber SJ, Davis TP, Yamamura HI, Hruby VJ. (1998) [¹²⁵I-Tyr1] biphalin binding to opioid receptors of rat brain and NG108-15 cell membranes. *Life Sci* 62:199-204.
- Slominski A, Paus R, Wortsman J. (1993) On the potential role of proopiomelanocortin in skin physiology and pathology. *Mol Cell Endocrinol* 93:C1-6.
- Slominski AT, Zmijewski MA, Zbytek B, Brozyna AA, Granese J, Pisarchik A, Szczesniwski A, Tobin DJ. (2011) Regulated proenkephalin expression in human skin and cultured skin cells. *J Invest Dermatol* 131:613-622.
- Smart D, Smith G, Lambert DG. (1994) μ -Opioid receptor stimulation of inositol (1,4,5) triphosphate formation via a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Neurochem* 62:1009-1014.
- Smith EM, Harbour-McMenamin D, Blalock JE. (1985) Lymphocyte production of endorphins and endorphin-mediated immunoregulatory activity. *J Immunol* 135:779-782.
- Smith G i Smith M (1995) Morphine-3-glucuronide: evidence to support its putative role in the development of tolerance to the antinociceptive effects of morphine in the rat. *Pain* 62: 51-60.
- Smith JA, Loughlin SE, Leslie FM. (1992) kappa-opioid inhibition of [³H]dopamine release from rat ventral mesencephalic dissociated cell cultures. *Mol Pharmacol* 42:575-583.
- Smith MT, Watt JA, Cramond T. (1990) Morphine-3-glucuronide-a potent antagonist of morphine analgesia. *Life Sci* 47:579-585.
- Smith MT. (2000) *Neuroexcitatory effects of morphine and hydromorphone: evidence implicating the 3-glucuronide metabolites*. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27:524-528.
- Sommer C. (2004) Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. *Mol Neurobiol* 30:117-125.
- Spetea M, Rydelius G, Nylander I, Ahmed M, Bileviciute-Ljungar I, Lundeberg T, Svensson S, Kreicbergs A. (2002) Alteration in endogenous opioid systems due to chronic inflammatory pain conditions. *Eur J Pharmacol* 435:245-252.
- Stefano GB, Salzet M, Hughes TK, Bilfinger TV. (1998) Delta-2 opioid receptor subtype on human vascular endothelium uncouples morphine stimulated nitric oxide release. *Int J Cardiol* 30:64:S43-51.

- Stefanoa GB, Salzeta M, Hughesd TK, Bilfingera TV. (1998). Delta-2 opioid receptor subtype on human vascular endothelium uncouples morphine stimulated nitric oxide release. *Int J Cardiol* 64:S43-S51.
- Stein C, Comisel K, Haimerl E, Yassouridis A, Lehrberger K, Herz A, Peter K (1991) Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. *N Engl J Med* 325:1123-1126.
- Stein C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N Engl J Med* 332:1685-1690.
- Stepinski J, Zajaczkowski I, Kazem-Bek D, Temeriusz A, Lipkowski AW, Tam SW. (1991) Use of hydrophilic diamines for bridging of two opioid peptide pharmacophores. Synthesis and receptor binding of two new analogues. *Int J Pept Protein Res* 38:588-592.
- Stewart JM, Getto CJ, Neldner K, Reeve EB, Krivoy WA, Zimmermann E. (1976) Substance P and analgesia. *Nature* 262:784-785.
- Sun WM, Read NW, Verlinden M. (1997) Effects of loperamide oxide on gastrointestinal transit time and anorectal function in patients with chronic diarrhoea and faecal incontinence. *Scand J Gastroenterol* 32:34-8.
- Szabo I, Rojavin M, Bussiere JL, Eisenstein TK, Adler MW, Rogers TJ. (1993) Suppression of peritoneal macrophage phagocytosis of *Candida albicans* by opioids. *J Pharmacol Exp Ther* 267:703-706.
- Tallent M, Dichter MA, Bell GI, Reisine T. (1994) The cloned kappa opioid receptor couples to an N-type calcium current in undifferentiated PC-12 cells. *Neurosci* 63:1033-1040.
- Tang JL, Lipkowski AW, Specter S. (1998) Inhibitory effect of biphalin and AZT on murine Friend leukemia virus infection in vitro. *Int J Immunopharmacol* 20:457-466.
- Tegeder I, Meier S, Burian M, Schmidt H, Geisslinger G, Lotsch J. (2003) Peripheral opioid analgesia in experimental human pain models. *Brain* 126:1092-1102.
- Terenius L. (1973) Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol* 33:377-384.
- Terskiy A, Wannemacher KM, Yadav PN, Tsai M, Tian B, Howells RD. (2007) Search of the human proteome for endomorphin-1 and endomorphin-2 precursor proteins. *Life Sci* 81:1593-1601.
- Thompson RC, Mansour A, Akil H, Watson SJ. (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat μ opioid receptor. *Neuron* 11:903-913.

- Tien LT, Lir-Wan Fan LW, Sogawa C, Ma T, Loh HH, Ho IK. (2004) Changes in acetylcholinesterase activity and muscarinic receptor bindings in μ -opioid receptor knockout mice. *Brain Res Mol Brain Res* 126:38-44.
- Tokuyama S, Inoue M, Fuchigami T, Ueda H. (1998) Lack of tolerance in peripheral opioid analgesia in mice. *Life Sci* 62:1677-1681.
- Tominaga M, Caterina MJ. (2004) Thermosensation and pain. *J Neurobiol* 61:3-12.
- Traynor JR, Clark MJ, Remmers AE. (2002) Relationship between rate and extent of G protein activation: comparison between full and partial opioid agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 300:157-161.
- Uceyler N, Schafers M, Sommer C. (2009) Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. *Exp Brain Res* 196:67-78.
- Ueda H, Inoue M. (1999) Peripheral morphine analgesia resistant to tolerance in chronic morphine-treated mice. *Neurosci Lett* 266:105-108.
- Vaccarino AL, Clemmons HR, Mader GJ Jr, Magnusson JE. (1997) A role of periaqueductal grey NMDA receptors in mediating formalin-induced pain in the rat. *Neurosci Lett* 236:117-119.
- van Dorp EL, Romberg R, Sarton E, Bovill JG, Dahan A (2006) Morphine-6-glucuronide: morphine's successor for postoperative pain relief? *Anesth Analg* 1789-1797.
- van Rossum D, Hanisch UK, Quirion R. (1997) Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 21:649-678.
- Vanderah TW, Largent-Milnes T, Lai J, Porreca F, Houghten RA, Menzaghi F, Wisniewski K, Stalewski J, Sueiras-Diaz J, Galyean R, Schteingart C, Junien JL, Trojnar J, Rivière PJ. (2008) Novel D-amino acid tetrapeptides produce potent antinociception by selectively acting at peripheral kappa-opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 583:62-72.
- Vanderah TW. (2010) Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain. *Clin J Pain* 26:10-15.
- Vane JR, Botting RM. (1998) Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 104:2-8.
- Vassou D, Bakogeorgou E, Kampa M, Dimitriou H, Hatzoglou A, Castanas E. (2008) Opioids modulate constitutive B-lymphocyte secretion. *Int Immunopharmacol* 8:634-644.

Vaughan CW i Connor M (2003) In search of a role for the morphine metabolite morphine-3-glucuronide. *Anesth Analg* 97:311-312.

Vetter I, Kapitzke D, Hermanussen S, Monteith GR, Cabot PJ. (2006) The effects of pH on beta-endorphin and morphine inhibition of calcium transients in dorsal root ganglion neurons. *J Pain* 7:488-499.

von Baeyer CL. (2006) Children's self-reports of pain intensity: Scale selection, limitations and interpretation. *Pain Res Manage* 11:157-162.

Wagner EJ, Ronnekleiv OK, Grandy DK, Kelly MJ. (1998) The peptide orphanin FQ inhibits beta-endorphin neurons and neurosecretory cells in the hypothalamic arcuate nucleus by activating an inwardly-rectifying K⁺ conductance. *Neuroendocrinology* 67:73-82.

Wahlstrom A, Winblad B, Bixo M, Rane A. (1988) Human brain metabolism of morphine and naloxone. *Pain* 35:121-127.

Wang H, Wessendorf MW. (2002) Mu- and delta-opioid receptor mRNAs are expressed in periaqueductal gray neurons projecting to the rostral ventromedial medulla. *Neurosci* 109:619-634.

Watanabe YS, Fukunishi Y, Nakamura H. (2004) Modelling of third cytoplasmic loop of bovine rhodopsin by multicanonical molecular dynamics. *J Mol Graph Model* 23:59-68.

Weber E, Esch FS, Bohlen P, Paterson S, Corbett AD, McKnight AT, Kosterlitz HW, Barchas JD, Evans CJ. (1983) Metorphamide: isolation, structure, and biologic activity of an amidated opioid octapeptide from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:7362-7366.

Wei LN, Law PY, Loh HH. (2004) Post-transcriptional regulation of opioid receptors in the nervous system. *Front Biosci* 9:1665-1679.

Wei LN, Loh HH. (2011) Transcriptional and epigenetic Regulation of opioid receptor genes-present and future. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51:75-97.

Weiss JL, Burgoyne RD. (2001) Voltage-independent inhibition of P/Q-type Ca²⁺ channels in adrenal chromaffin cells via a neuronal Ca²⁺ sensor-1-dependent pathway involves Src family tyrosine kinase. *J Biol Chem* 276:44804-44811.

Wells T, Forsling ML. (1991) Kappa-opioid modulation of vasopressin secretion in conscious rats. *J Endocrinol* 129:411-416.

Wick MJ, Minnerath SR, Roy S, Ramakrishnan S, Loh HH. (1995) Expression of alternate forms of brain opioid 'orphan' receptor mRNA in activated human peripheral blood lymphocytes and lymphocytic cell lines. *Brain Res Mol Brain Res* 32:342-347.

- Witta J, Palkovits M, Rosenberger J, Cox BM. (2004) Distribution of nociceptin/orphanin FQ in adult human brain. *Brain Res* 997:24-29.
- Wittwer E i Kern SE. (2006) Role of morphine's metabolites in analgesia: concepts and controversies. *AAPS J* 8:348-352.
- Wolff R, Aune D, Truyers C, V Hernandez A, Misso K, Riemsma R, Kleijnen J. (2012) Systematic review of efficacy and safety of buprenorphine versus fentanyl or morphine in patients with chronic moderate to severe pain. *Curr Med Res Opin* 28:833-845.
- Woolf CJ. Intrathecal high dose morphine produces hyperalgesia in the rat. (1981) *Brain Res* 209:491-495.
- World Health Organization (WHO): Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020. International Agency for research on Cancer (IARC), Geneva 2003.
- World Health Organization. Cancer pain relief. Geneva 1986.
- Wright AW, Mather LE, Smith MT (2001) Hydromorphone-3-glucuronide: a more potent neuro-excitant than its structural analogue, morphine-3-glucuronide. *Life Sci* 69:409-420.
- Wronkowski Z., Zwierko M.: Epidemiologia czerniaka skóry. [W:] Czerniaki skóry u dorosłych. Ruka W., Nowecki Z.I., Rutkowski P. (red.). MediPage, Warszawa 2005, 9-16.
- Wu CT, Yu JC, Yeh CC, Liu ST, Li CY, Ho ST, Wong CS. (1999) Preincisional dextromethorphan treatment decreases postoperative pain and opioid requirement after laparoscopic cholecystectomy. *Anesth Analg* 88:1331-1334.
- Wu LJ, Xu H, Ko SW, Yoshimura M, Zhuo M. (2005) Feed-forward inhibition: a novel cellular mechanism for the analgesic effect of substance P. *Mol Pain* 1:34.
- Xu XJ, Hao JX, Wiesenfeld-Hallin Z. (1996) Nociceptin or antinociceptin: potent spinal antinociceptive effect of orphanin FQ/nociceptin in the rat. *Neuroreport* 7:2092-2094.
- Xu XJ, Puke MJ, Verge VM, Wiesenfeld-Hallin Z, Hughes J, Hokfelt T. (1993) Up-regulation of cholecystokinin in primary sensory neurons is associated with morphine insensitivity in experimental neuropathic pain in the rat. *Neurosci Lett* 152:129-132.
- Xu Y, Tian XB, An K, Yang H, Tian YK. (2008) Lumbar transplantation of immortalized enkephalin-expressing astrocytes attenuates chronic neuropathic pain. *Eur J Pain* 12:525-533.
- Yamada R, Kera Y. (1998) D-amino acid hydrolysing enzymes. *EXS* 85:145-155.

- Yamazaki M, Suzuki T, Narita M, Lipkowski AW. (2001) The opioid peptide analogue biphalin induces less physical dependence than morphine. *Life Sci.* 69:1023-1028.
- Yang YM, Chung JM, Rhim H. (2007) Cholecystokinin-8S-induced intracellular calcium signaling in acutely isolated periaqueductal gray neurons of the rat. *Biol Pharm Bull* 30:297-302.
- Yang H, McNearney TA, Chu R, Lu Y, Ren Y, Yeomans DC, Wilson SP, Westlund KN. (2008) Enkephalin-encoding herpes simplex virus-1 decreases inflammation and hotplate sensitivity in a chronic pancreatitis model. *Mol Pain* 28:4-8.
- Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI. (1993) Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proceedings Natl Acad Sci USA* 90:6736- 6740.
- Ye Y, Dang D, Zhang J, Viet CT, Lam DK, Dolan JC, Gibbs JL, Schmidt BL. (2011) Nerve growth factor links oral cancer progression, pain, and cachexia. *Mol Cancer Ther* 10:1667-1676.
- Ye Z, Wimalawansa SJ, Westlund KN (1999) Receptor for calcitonin gene-related peptide: localization in the dorsal and ventral spinal cord. *Neurosci* 92:1389-1397.
- Yoshimura H, Ida S, Oguri K, Tsukamoto H. (1973) Biochemical basis for analgesic activity of morphine-6-glucuronide. Penetration of morphine-6-glucuronide in the brain of rats. *Biochem Pharmacol* 22:1423-1430.
- Yue Q, Odar-Cederlof I, Svensson JO, Sawe J. (1988) Glucuronidation of morphine in human kidney microsomes. *Pharmacol Toxicol* 63:337-341.
- Zadina JE, Kastin AJ, Ge LJ, Hackler L. (1994) 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* 55:461-466.
- Zadina JE, Hackler L, Ge L-J, Kastin AJ. (1997) A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature* 386:499-502.
- Zagon I, McLaughlin P. (2003) Opioids and the apoptotic pathway in human cancer cells. *Neuropeptides* 37:79-88.
- Zagon IS, Donahue RN, Bonneau RH, McLaughlin PJ. (2011) B lymphocyte proliferation is suppressed by the opioid growth factor-opioid growth factor receptor axis: Implication for the treatment of autoimmune diseases. *Immunobiology* 216:173-183.
- Zagon IS, Donahue RN, Bonneau RH, McLaughlin PJ. (2011) B lymphocyte proliferation is suppressed by the opioid growth factor-opioid growth factor receptor axis: Implication for the treatment of autoimmune diseases. *Immunobiol* 216:173-183.

- Zech DFJ, Grond S, Lynch J, Hertel D, Lehmann KA. (1995) Validation of World Health Organization Guidelines for cancer pain relief: a 10-year prospective study. *Pain* 63:65-76.
- Zeitz KP, Malmberg AB, Gilbert H, Basbaum AI. (2001) Reduced development of tolerance to the analgesic effects of morphine and clonidine in PKC gamma mutant mice. *Pain* 94:245-53.
- Zelcer S, Kolesnikov Y, Kovalyshyn I, Pasternak DA, Pasternak GW. (2005) Selective potentiation of opioid analgesia by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Brain Res* 1040:151-156.
- Zhang G, Chen W, Marvizon JC. (2010) Src family kinases mediate the inhibition of substance P release in the rat spinal cord by μ -opioid receptors and GABA(B) receptors, but not α 2 adrenergic receptors. *Eur J Neurosci* 32:963-973.
- Zhang J, Gibney GT, Zhao P, Xia Y. (2002) Neuroprotective role of delta-opioid receptors in cortical neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C1225-1234.
- Zhang Z, Chen TY, Kirsch JR, Toung TJ, Traystman RJ, Koehler RC, Hurn PD, Bhardwaj A. (2003) Kappa-opioid receptor selectivity for ischemic neuroprotection with BRL 52537 in rats. *Anesth Analg* 97:1776-1783.
- Zhao W, Liu H, Xu S, Entschladen F, Niggemann B, Zanker KS, Han R. (2001) Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase. *Cancer Lett* 162:49-55.
- Zhao P, Huang Y, Zuo Z. (2006) Opioid preconditioning induces opioid receptor-dependent delayed neuroprotection against ischemia in rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:945-952.
- Zollner C, Shaqura MA, Bopaiah CP, Mousa S, Stein C, and Schafer M. (2003) Painful inflammation-induced increase in μ -opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Mol Pharmacol* 64:202-210.