

Podsumowanie rozprawy doktorskiej w języku polskim

Ból ostry ma istotne znaczenie dla rozpoznania i umiejscowienia procesu chorobowego oraz uniknięcia lub zminimalizowania uszkodzenia tkanki. W przeciwieństwie do niego, ból przewlekły utrzymujący się pomimo zagojenia uszkodzonych tkanek, bądź towarzyszący chorobie przewlekłej, nie spełnia funkcji ostrzegawczej i wymaga leczenia. Obecnie przyjęta farmakoterapia bólu przewlekłego, opiera się o niesteroidowe leki przeciwzapalne, opioidy oraz leki przeciwdepresyjne, które nie zawsze przynoszą wystarczający efekt przeciwbólowy, niosą natomiast ryzyko wystąpienia niebezpiecznych działań niepożądanych. Do najczęstszych należą min. krwawienia z układu pokarmowego w przypadku NLPZ oraz depresja ośrodka oddechowego, a także rozwoju tolerancji i uzależnienia w przypadku opioidów (Ray i wsp., 2007; Gallagher i Rosenthal, 2008; Williams i wsp., 2013). Analiza epidemiologiczna starzejących się społeczeństw krajów wysokorozwiniętych, wskazuje na ból przewlekły jako chorobę cywilizacyjną, o braku zadawalającej terapii (Müller-Schwefe, 2011). Aby rozwinąć nowe metody leczenia tego schorzenia konieczne jest lepsze zrozumienie funkcjonalnej interakcji pomiędzy endogennymi układami zaangażowanymi w percepcję bodźców bólowych.

Celem rozprawy doktorskiej było określenie udziału układu endokanabinoidowego (CB1/2) i endowanoloidowego (TRPV1) w rozwoju i terapii bólu przewlekłego, ze szczególnym uwzględnieniem tej interakcji w bólu neuropatycznym i bólu związanego z osteoartrozą, które stanowią większość klinicznych przypadków bólu przewlekłego (Müller-Schwefe, 2011).

Badania przeprowadzono w przedklinicznych modelach zwierzęcych, reprezentujących wysoki poziom przeniesienia uzyskanych wyników farmakologicznych na warunki kliniczne: modelu CCI (bólu neuropatycznego; ang. *chronic constriction injury to the sciatic nerve*; wg Bennett i Xie, 1988) oraz modelu MIA (bólu związanego z osteoartrozą; ang. *osteoarthritis sodium monoiodoacetate model*; wg Kalbhen, 1987). Ocena właściwości przeciwbólowych badanych związków została przeprowadzona z wykorzystaniem testów: wrażliwości na bodziec mechaniczny – test von Frey’a i bodziec termiczny – test zimnej płytki dla modelu CCI oraz test oceny obciążenia łapy DWB (ang. *dynamic weight bearing*) i pomiaru nacisku na staw kolanowy PAM (ang. *pressure application measurement*) dla modelu MIA. Badania behawioralne pozwoliły na skorelowanie zmian molekularnych zachodzących w tkance nerwowej zwierząt z fenotypem bólowym oraz umożliwiły wybranie odpowiedniego punktu czasowego do zastosowania proponowanej terapii przeciwbólowej. Zmiany molekularne w układzie endokanabinoidowym i endowanoloidowym zostały zbadane na poziomie mRNA (RT-qPCR; ang. *Real-Time quantitate polymerase chain reaction*), białek (Western Blot i barwienia immunofluorescencyjne) oraz na podstawie analizy lipidów

(LC-MS; *ang.* liquid chromatography-mass spectroscopy). Badania zostały przeprowadzone w zwojach korzeni grzbietowych (DRG; *ang.* dorsal root ganglia) oraz w rdzeniu kręgowym (część grzbietowa lędźwiowego odcinka rdzenia kręgowego) na poziomie L4-L6. Obie struktury są istotnymi elementami wstępującej drogi rdzeniowo-wzgórzowej oraz stanowią miejsce działania badanych związków po podaniu obwodowym i nardzeniowym.

Uzyskane w toku naszych badań, wyniki wykazały zmiany w ekspresji receptorów CB1, CB2 i TRPV1 oraz enzymów odpowiedzialnych za syntezę i degradację endogennego endokanabinoidu, anandamidu (AEA) podczas rozwoju bólu neuropatycznego. Dane wskazują, że podczas rozwoju symptomów bólowych: hiperalgezji i allodynii, dochodzi do wzrostu ekspresji receptora CB2, zarówno w DRG, jak i w rdzeniu kręgowym. Mimo braku zmian ilości enzymu klasycznej ścieżki syntezy AEA: NAPE-PLD, zaobserwowano wzrost ekspresji enzymów alternatywnych dróg syntezy (PLA2 oraz SHIP1). Dodatkowo enzymy degradujące AEA (FAAH i LOX12/15) wykazywały wzrosty ekspresji w badanych strukturach (*Malek i wsp., 2014*)¹. Dane te poszerzyły dotychczasową wiedzę na temat zmian zachodzących w systemie endokanabinoidowym w przebiegu bólu neuropatycznego. Badania wykazały zmiany w alternatywnych ścieżkach syntezy i degradacji AEA, które mogą tłumaczyć zmiany poziomów endokanabinoidów w przebiegu bólu przewlekłego oraz świadczą o dużej plastyczności układu. Ponieważ AEA jest agonistą receptora TRPV1, przebadano również ekspresję cytokin i kinaz odpowiedzialnych za sensytyzację tego receptora na drodze fosforylacji w DRG w zwierzęcym modelu CCI. Otrzymane dane wskazują na wzrost ekspresji TNF α oraz NGF w początkowym etapie rozwoju neuropatii oraz silny wzrost ekspresji kinazy PKC ϵ w dalszych etapach rozwoju choroby. Wyniki badań sugerowały, że inne czynniki mają udział w sensytyzacji receptora podczas przekształcenia bólu z ostrego w neuropatyczny, a inne w podtrzymanie aktywacji TRPV1 w trakcie trwania schorzenia. W oparciu o uzyskane dane zaproponowano nowe cele molekularne dla leczenia bólu przewlekłego związanego z uszkodzeniem nerwów (*Malek i wsp., 2015b*).

Opisanie udziału układów endokanabinoidowego oraz endowanoloidowego w rozwoju bólu przewlekłego stanowiło uzasadnienie do zastosowania związków modulujących aktywność tych układów, jako nowych związków o potencjalnym działaniu przeciwbólowym. Ponieważ układy te charakteryzują się wysoką redundancją i plastycznością, farmakologiczne interwencje ukierunkowane na jeden cel molekularny nie wykazały zadawalających właściwości przeciwbólowych (*Di Marzo, 2012; Huggins i wsp., 2012; Gavva i wsp., 2007*). Celem kolejnych badań była ocena skuteczności przeciwbólowego działania związków będących jednocześnie antagonistami receptora TRPV1 oraz inhibitorami enzymu FAAH (tj. AA-5-HT oraz OMDM-198) w behawioralnych modelach bólu przewlekłego oraz

¹Publikacje oznaczone pogrubioną czcionką stanowią część rozprawy doktorskiej, natomiast podkreślone wskazują na inne osiągnięcia autora.

określenie korzyści wynikających z ich dwukierunkowego profilu działania, w porównaniu do związków działających wyłącznie na jeden z elementów układów (FAAH lub TRPV1). W toku przeprowadzonych doświadczeń zbadano właściwości przeciwbólowe związków hybrydowych, wpływających na więcej niż jeden cel biologiczny, które mogą wykazywać korzystniejszy profil działania, większą skuteczność terapeutyczną oraz mniej działań niepożądanych, (co wynika z możliwości stosowania niższych dawek) w porównaniu ze związkami selektywnymi wobec jednego punktu uchwytu (szczegóły w *Malek i Starowicz, 2016*).

W zwierzęcym modelu bólu neuropatycznego przeprowadzone badania wykazały przeciwbólową aktywność związku AA-5-HT po podaniu nardzeniowym. Udowodniono, że efekt przeciwbólowy był zależny od receptora CB2, który znajduje się na komórkach mikroglejowych odpowiedzialnych za odpowiedź zapalną w ośrodkowym układzie nerwowym. Przeprowadzono również analizę poziomów endogennych kanabinoidów, która wykazała zwiększoną ilość AEA w DRG zwierząt w odpowiedzi na podanie AA-5-HT. Co więcej, ilość PEA, endogennej aminy odpowiedzialnej za wzmocnienie przeciwbólowego działania AEA, była podwyższona na poziomie rdzenia kręgowego po nardzeniowym podaniu AA-5-HT. Badania przyczyniły się do zrozumienia mechanizmu działania badanego związku hybrydowego na poziomie ośrodkowego układu nerwowego, który (prawdopodobnie) jest zależny od aktywacji receptorów CB2 w komórkach mikroglejowych (*Malek i wsp., 2016; Malek i wsp., 2015c*). Z kolei, w zwierzęcym modelu osteoartrozy wykazano przeciwbólowe właściwości innego związku hybrydowego: OMDM-198 (bardziej stabilnego w środowisku wodnym, dlatego przystosowanego do podań dootrzewnowych). Efekt działania OMDM-198 był silniejszy od działania selektywnego antagonisty TRPV1, SB-366,791 oraz selektywnego inhibitora FAAH, URB-597. Efekt OMDM-198 ulegał osłabieniu w obecności antagonisty receptora CB1, AM-251, co wskazuje, że związek ten posiada właściwości „pośredniego” (poprzez bezpośrednie zablokowanie degradacji endogennego agonisty – AEA) agonisty CB1 (*ang indirect agonist*). Wyniki te udowadniają, że proponowana strategia działania przeciwbólowego skierowanego na dwa cele molekularne w terapii bólu przewlekłego oferuje korzyści w stosunku do selektywnych inhibitorów działających wybiórczo na jeden układ receptorowy (*Malek i wsp., 2015a*).

Przeprowadzone badania mechanizmów molekularnych zmian zachodzących w czasie rozwoju bólu przewlekłego oraz opracowanie interakcji dwóch różnych układów endogennych kontrolujących przekąźnictwo nocyceptywne stanowią podstawę do alternatywnego podejścia leczenia bólu przewlekłego z wykorzystaniem dualistycznej natury ligandów oddziałujących z układami endokanabinoidowym i endowaniłoidowym. Zweryfikowanie skuteczności przeciwbólowej związków hybrydowych, w dwóch różnych modelach zwierzęcych, może przyczynić się do opracowania nowej, skuteczniejszej

i powszechnie stosowanej terapii bólu przewlekłego, bez względu na przyczynę i mechanizmy jego powstania.