

НОЦИЦЕПТИН И ПИЛОТНИ ОПИТИ ЗА ОТКРИВАНЕ ФАРМАКОЛОГИЧНИ ЕФЕКТИ НА НЕГОВИ КЪСОВЕРИЖНИ АНАЛОЗИ

Светлана Стоева¹, Любка Танчева¹, Стела Драгоманова², Тамара Пайпанова³,
Мариета Георгиева²

¹Институт по невробиология, ³Институт по молекулярна биология, Българска академия на науките-София и ²Катедра по предклинична и клинична фармакология, Факултет по медицина, Медицински университет-Варна

NOCICEPTIN AND PILOT EXPERIMENTS TO DETECT PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF ITS SHORT-CHAIN ANALOGUES

Svetlana Stoeva¹, Lyubka Tancheva¹, Stela Dragomanova², Tamara Paypanova³,
Marieta Georgieva²

¹Institute of Neurobiology, ³Institute of Molecular Biology, Bulgarian Academy of Sciences and ²Department of Preclinical and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Ноцицептин (орфанин) е ендегенен лиганд, свързващ се с ноцицептинов рецептор (NOP, ORL-1). Той притежава антиналгетични ефекти. Рецепторът е широко експресиран в мозъчните структури. Пептидомиметиците са молекули с къса верига, наподобяващи пептиди, с характерни фармакокинетични свойства. Целта на изследването е да се проучат основните фармакологични и токсикологични ефекти на два новосинтезирани пептида (P1 и P2) при мишки. Анализирани беше активността им върху ЦНС, както и влиянието им върху хексобарбиталов сън. Аналгетичната активност на двете вещества беше изследвана с тест с оцетна киселина. По същия метод бе проучен и дозозависимият ефект на аналгетичната активност на P2. Установи се, че P2 притежава антиноцицептивни свойства, което го прави подходящ за по-нататъшни проучвания в тази насока.

Ключови думи: ноцицептин, аналози, пептидомиметици, хексобарбитал, наркоза

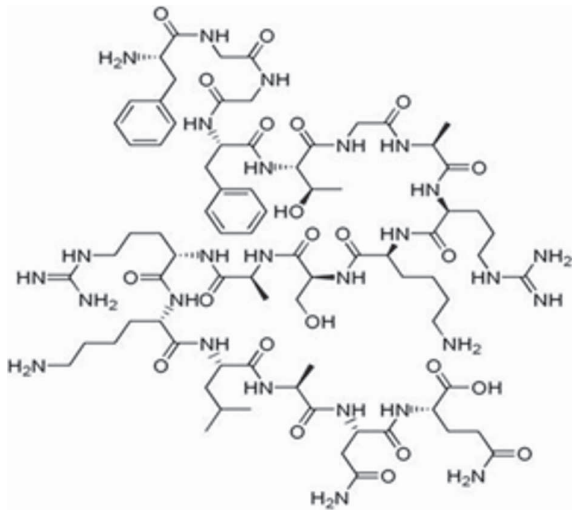
ABSTRACT

Nociceptin, or orphanin FQ, is an endogenous ligand for the nociceptin receptor (NOP, ORL-1). It is a potent antianalgesic agent. The receptor is widely distributed in brain structures. Peptidomimetics are short-chain molecules designed to mimic peptides and with typical pharmacokinetic properties. The aim of the study is to investigate the basic pharmacological and toxicological effects of two newly-synthesized neuropeptides (P1 and P2) in mice. Their activity on the CNS and their influence on the hexobarbital-induced narcosis as well were studied. The analgesic activity of these two compounds was examined by using acetic acid test. Dose-dependent effect of the analgesic activity of compound P2 was independently studied by means of the same method. It was established that P2 possessed antinociceptive properties which makes it suitable for further research in this direction.

Key words: nociceptin, analogues, peptidomimetics, hexobarbital, narcosis

ВЪВЕДЕНИЕ

Ендогените опиоидни пептиди са близки по структура молекули, които се свързват с контрола на множество физиологични функции. Те се синтезират и освобождават от неврони в централната и периферната нервна система. Упражняват ефектите си чрез взаимодействие със специфични мембранни рецептори - μ , κ и δ . През 1994 г. няколко лаборатории паралелно описват четвърти рецептор от семейството на опиоидните рецептори с неизвестен ендогенен лиганд. Поради трудността да се охарактеризира, този рецептор се счита за орфанинов (от англ. "orphan" - сираче). Необичайните особености на този вид рецептори довежда до предположението, че съществува ендогенен субстрат, различен от ендогенните опиоиди, който ги повлиява. През 1995 г. този лиганд е открит в две независими лаборатории. Едната група изследователи го нарича orphanin FQ (20) поради афинитета му към орфаниновия рецептор (FQ посочва първата и последната аминокиселина в състава му - фенилаланин и глутамин). Другата група го нарича ноцицептин (12) поради проноцицептивната му активност (Фиг. 1).



Фиг. 1. Структура на ноцицептина

Клетъчен механизъм и действие на ноцицептина

Свързването на ноцицептина с NOP-рецептора е доказано за първи път чрез използване на радиоактивен лиганд (20). Ноцицептиновите рецептори са типични Gi/Go-протеин-купирани трансмембранни рецептори със седм домейна 7ТМ. Предполага се, че свързваща-

та част на рецептора обхваща няколко трансмембранни домейна (14).

Подобно на класическите опиоидни рецептори, ноцицептиновият рецептор е свързан с инхибиторни G-протеини и има подобни трансдукционни механизми. Активирането им води до: затваряне на потенциалзависими Ca^{2+} -канални (9), стимулиране на екстрацелуларното преминаване на K^+ йони, водещо до хиперполяризация (2) и намаляване на нивата на cAMP чрез инхибиране на аденилатциклазата. В резултатът на това невроналната клетъчна възбудимост се понижава, което води до потискане на предаването на нервните импулси едновременно с инхибиране на невротрансмитерното освобождаване (11).

Клетъчните ефекти на ноцицептина предполагат като цяло инхибиторно действие, най-често осъществявано чрез пресинаптично потискане на освобождаването на невротрансмитери (22).

Независимо от приликите в механизма на действие на клетъчно ниво, NOP-рецепторът се различава от опиоидните рецептори по фармакологичните си отнасяния. В някои случаи той е даже противоположен (3). Така напр. N/OFFQ предизвиква хипералгезия или аналгезия чрез повлияване на рецептори, фармакологично различни от традиционните опиоидни рецептори. Предполага се, че различните ефекти на ноцицептиновите рецептори се дължи на NOP-рецепторна хетерогенност (10).

Разпределение на NOP-рецептора и по-важни биологични ефекти на ноцицептина

NOP-рецептори се откриват в симпатикови, парасимпатикови и сетивни неврони (6). Налице е разлика в концентрациите на ноцицептина в различни мозъчни структури, свързана с плътността на рецепторите. Най-голяма е концентрацията в кортекса и тя намалява в по-дълбоките структури (10). NOP-рецептори се експресират в някои периферни органи и системи - дихателна (5), сърдечно-съдова (11), отделителна (8), имунна система и периферните ганглии (14) и гастроинтестинален тракт (17).

Предполага се, че N/OFFQ/NOP-системата в организма играе собствена физиологична роля и участва в регулацията на физиологични процеси (15), включващи:

- възприемане и предаване на болката (12,20);
- обучение и запаметяване (21);
- внимание и емоции (13);
- адаптиране в отговор на безпокойство и стрес (16);
- мускулен тонус и движение (16);

терморегулация (23);
дишане (18);
контрол на апетита (19) и др.

Съобщават се данни, че ноцицептинът повлиява хипоталамо-хипофизната ос и репродуктивното поведение (1). Напоследък все повече се обръща внимание на патофизиологичната роля на ноцицептиновата пептидергична система за възникването на различни заболявания.

Обект на настоящото изследване са два нови късверижни невропептида, синтезирани от Тамара Пайпанова (2013). Първият от тях е аналог на Туг-MIF-1, а вторият - на ноцицептина. Имайки предвид химичните им характеристики, сходни с тези на някои невротрансмитери, както и предварителни наши данни, предположихме, че те оказват влияние върху ЦНС.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

При албино-ICR мишки бяха изследвани някои основни токсикологични отнасяния на проучваните невропептиди в определени дози (5, 10, 20 и 50 mg/kg i.p.). Изследването включи тяхното действие върху ЦНС и влиянието им върху времето на хексобарбиталов сън (ХБ - 100 mg/kg b.m.). Влиянието на двете вещества върху ноцицепцията при мишки беше проучено след приложението на ефективни дози от 4, 8 и 16 mg/kg i.p. (4).

Върху мъжки ICR мишки бяха изследвани някои основни токсикологични характеристики на невропептидите в няколко дози (5, 10, 20 и 50 mg/kg i.p.). Техните ефекти и токсичност бяха проучени до 48-я час. Изследването на пролонгираната токсичност продължи до 5-ия ден, като се проследи промените в апетита, поведението и телесния растеж.

Действието на новите вещества върху ЦНС беше изследвано чрез отчитане на тяхното влияние върху времето на ХБ сън (ХБ - 100 mg/kg i.p.). ХБ повлиява ЦНС, но е и субстрат за чернодробната цитохром Р450 монооксигеназа. Изследваните пептиди бяха въведени в ефективна доза 5 mg/kg i.p. 20 мин. преди назначаването на ХБ. Промяната в продължителността на ХБ сън (в мин.) беше отчетена по групи съобразно техният рефлекс на обръщане.

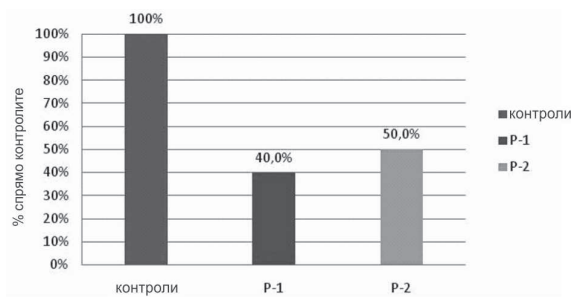
Двете вещества бяха изследвани в ефективни дози 5 mg/kg за аналгетичен ефект чрез тест с оцетна киселина (7). Отчете се броят на абдоминалните спазми 20 мин. след въвеждането на оцетната киселина. Дозо-зависимият ефект на аналгетичната активност на веществото Р-2 в дози 4, 8 и 16 mg/kg i.p. беше изследвана по същия метод.

Резултатите бяха представени чрез използване на *t*-test на Student Fisher.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Ние установихме ниска токсичност на двете вещества. Нямаше смъртни случаи при дозите, изследвани на 48-ия час (над 50 mg/kg b. m.). В доза 50 mg/kg b. m. веществата доведоха до атаксия, дихателни промени и седация. Не бяха открити промени в телесния растеж, апетита и поведението на животните след третиране с Р-1 и Р-2 в дози 5,10 и 20 mg/kg i.p.) в сравнение с контролите. Веществата са фармакологично активни в доза 5 mg/kg i.p.

След 5 дни на администриране беше открита пролонгирана токсичност. Не се наблюдаваха патологични промени във вътрешните органи. Установихме, че веществата (Р-1 и Р-2) намаляват продължителността на ХБ наркоза (Р-1 с 40%, а Р-2 - с над 50%) по неизвестен механизъм (фиг. 2). Възможно е новите субстанции да ускоряват елиминирането на ХБ по чернодробен механизъм. Ние предполагахме, че лекарственото взаимодействие може да се дължи най-вече на функционален антагонизъм между ХБ и новите невропептиди на нивото на ЦНС и/или по рецепторен механизъм. Само бъдещи изследвания биха могли да докажат, какъв е механизъмът на действие.

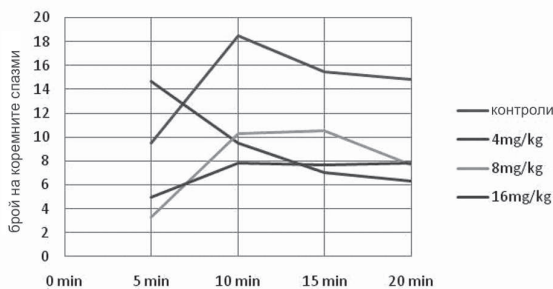


Фиг. 2. Ефекти на Р-1 и Р-2 върху продължителността на ХБ-сън

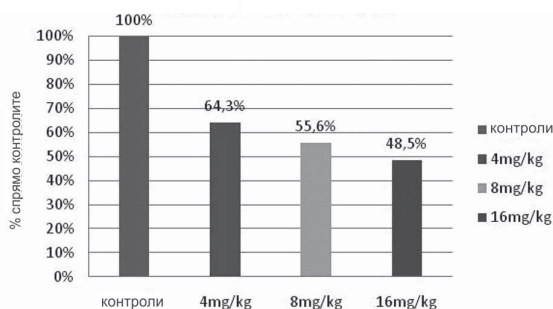
Нашите изследвания върху аналгетичното действие показват, че двата новосинтезирани пептида имат противоположни ефекти върху ноцицепцията – Р-1 я увеличава (с 262%), а Р-2 я намалява с повече от 25% (фиг. 3). Предположихме, че установеният ноцицептивен ефект на вещество Р1 се дължи на увеличаване на локалното дразнене при животните след комбинирано приложение на веществото с оцетна киселина.

Нашите експерименти показват, че веществото Р-2 има забележителен аналгетичен ефект и той е дозо-зависим (фиг. 3 и фиг. 4). При използването на три

доза от веществото P-2 (4, 8 и 16 mg/kg b. m. i.p.) този ефект е по-значителен в сравнение с ефекта при контролната група. Механизмът му е неясен. Ние предположихме, че той може да бъде свързан с химичната структура на P2, близка до медиатора ноцицептин. Вероятно модулацията на болката е резултат от взаимодействието с някои ЦНС-рецептори и заслужава по-нататъшни изследвания.



Фиг. 3. Дозо-зависим аналгетичен ефект на P-2 според теста с оцетна киселина



Фиг. 4. Аналгетичен ефект на P-2

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новосинтезираните неuropeптиди показват ниска токсичност и антагонизират времето на ХБ сън при мишки. Веществото P-2 има дозо-зависим аналгетичен ефект и като производно на ноцицептина заслужава бъдещи изследвания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Champion, H. C., R. Wang, W. J. Hellstrom, P. J. Kadowitz. Nociceptin, a novel endogenous ligand for the ORL1 receptor, has potent erectile activity in the cat.- *Am. J. Physiol.*, **273**, 1997, No 1, Pt 1, E214-E219.
2. Connor, M., B. Vaughan, B. Chieng, M. J. Christie. Nociceptin receptor coupling to a potassium conductance in rat locus coeruleus neurones in vitro.- *Br. J. Pharmacol.*, **119**, 1996, No 8, 1614-1618.

3. Connor, M., M. J. Christie. Opioid receptor signalling mechanisms.- *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **26**, 1999, No 7, 493-499.
4. Encheva, E., L. Tancheva, R. Klisurov, et al. Pharmacological modulation of aggressive behavior in rats with new peptidomimetics.- In: European Conference of Psychopharmacological Researches. Barcelona, 8-10.X.2013.
5. Fisher, A., W.-G. Forssmann, B. J. Udem. Nociceptin-induced inhibition of tachykinergic neurotransmission in guinea pig bronchus.- *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 1998, No 2, 902-907
6. Giuliani, S., C. A. Maggi. Prejunctional modulation by nociceptin of nerve-mediated inotropic responses in guinea-pig left atrium.- *Eur. J. Pharmacol.*, **332**, 1997, No 3, 231-236.
7. Hendershot, L. C., J. Forsaith. Antagonism of frequency of phenylquinone-inducing writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics.- *Pharmacol. Exp. Ther.*, **125**, 1959, 237-240.
8. Kapusta, D. R. Neurohumoral effects of orphanin FQ/nociceptin: relevance to cardiovascular and renal function.- *Peptides*, **21**, 2000, No 7, 1081-1099.
9. Knoflach, F., R. K. Reinscheid, O. Civelli, J. A. Kemp. Modulation of voltage-gated calcium channels by orphanin FQ in freshly dissociated hippocampal neurons.- *J. Neurosci.*, **16**, 1996, No 21, 6657-6664.
10. Letchworth, S. R., J. P. Mathis, G. C. Rossi, et al. Autoradiographic localization of (125)I[Tyr(14)]orphanin FQ/nociceptin and (125)I[Tyr(10)]orphanin FQ/nociceptin(1-11) binding sites in rat brain.- *J. Comp. Neurol.*, **423**, 2000, No 2, 319-329.
11. McDonald, J., D. G. Lambert. Opioids receptors.- *Contin. Educ. Anaesh. Crit. Care Pain*, **5**, 2005, No 1, 22-25.
12. Meunier, J. C., C. Mollereau, L. Toll, et al. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor.- *Nature*, **377**, 1995, No 6549, 532-535.
13. Mollereau, C., M. Parmentier, P. Mailleux, et al. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization.- *FEBS Lett.*, **341**, 1994, No 1, 33-38.

14. Mollereau, C., L. Mouledous. Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor.- *Peptides*, **21**, 2000, No 7, 907-917.
15. Narayanan, S., N. T. Maidment. Orphanin FQ and behavioral sensitization to cocaine.- *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **63**, 1999, No 2, 271-277.
16. Neal, C. R. Jr, A. Mansour, R. Reinscheid, et al. Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: comparison of ORL1 receptor mRNA expression with ¹²⁵I-[¹⁴Tyr]- orphanin FQ binding.- *J. Comp. Neurol.*, **412**, 1999, No 4, 563-605.
17. O'Donnell, A. M., L. M. Ellis, M. S. Riedl, et al. Distribution and chemical coding of orphanin FQ/nociceptin-immunoreactive neurons in the myenteric plexus of guinea pig intestines and sphincter of Oddi.- *J. Comp. Neurol.*, **430**, 2001, No 1, 1-11.
18. Peiser, C., B. J. Udem, A. Fischer. Nociceptin effects in the airways.- *Peptides*, **21**, 2000, No 7, 995-998.
19. Pomonis, J. D., C. J. Billington, A. S. Levine. Orphanin FQ, agonist of orphan opioid receptor ORL1, stimulates feeding in rats.- *Neuroreport*, **8**, 1996, No 1, 369-371.
20. Reinscheid, R. K., H. P. Nothacker, A. Bourson, et al. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor.- *Science*, **270**, 1995, No 5237, 792-794.
21. Sandin, J., J. Georgieva, P. A. Schött, et al. Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats.- *Eur. J. Neurosci.*, **9**, 1997, No 1, 194-197.
22. Vlaskovska, M., L. Kasakov. Nociceptin/Orphanin FQ. The novel peptide with old regulatory functions.- *Biomed. Rev.*, **11**, 2000, 1-12.
23. Yakimova, K. S. F. K. Pierau. Nociceptin/orphanin FQ: effects on thermoregulation in rats.- *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **21**, 1999, No 5, 345-352.

Адрес за кореспонденция:

Светлана Стоева

Институт по невробиология,

Българска академия на науките,

гр. София 1113, ул. „Акад. Георги Бончев“, бл. 23

E-mail: mdsvetlana@abv.bg