

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

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 tumorogenezy. 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 analgezą 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 opioidowych 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 hydrazydowego łączniem karbonylodihydazydowym. Modyfikacje strukturalne analogów bifaliny nie miały wpływu na efektywność z jaką stymulowały one wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe zależne od białka G w analizie [^{35}S]GTPyS. 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 hydrazydowego, będącego elementem zapewniającym odporność na degradację enzymatyczną.

Doświadczenia farmakologiczne potwierdziły również zróżnicowany udział ośrodkowych oraz obwodowych receptorów opioidowych w odpowiedzi przeciwbólowej uzyskanej po dożylnym podaniu badanych peptydów opioidowych 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 bialina w większym stopniu niż morfina czy analog 5311 manifestowała swoje działanie analgetyczne poprzez obwodowe receptory opiodowe, 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 bialiny wynika z odmiennych od morfiny możliwości przenikania BBB. Bialina 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 bialiny w tkankach obwodowych jest dostatecznie wysokie aby wywołać znacznie silniejszy obwodowy efekt analgetyczny. Po podaniu ostrym bialina 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 20μmol/kg bialiny i peptydu 5320 zaobserwowano także mniejszy rozwój tolerancji ośrodkowej niż w przypadku morfiny. Dodatkowo analog 5320 w stężeniu 100μM 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 bialiny 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, bialina, dimeryczne analogi enkefalin