

УЧАСТИЕ НА НИТРИКОКСАЙДЕРГИЧНАТА СИСТЕМА В АНАЛГЕТИЧНИТЕ ЕФЕКТИ НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ НОЦИЦЕПТИНОВИ АНАЛОЗИ СЛЕД ХРОНИЧЕН ИМОБИЛИЗАЦИОНЕН СТРЕС

Ивелина Химчева¹, Галя Ставрева², Армине Григорян¹, Анелия Димитрова¹,
Адриана Бочева¹

¹Катедра „Физиология и патофизиология“, Факултет по медицина, МУ-Плевен

²Катедра „Фармакология и токсикология“, Факултет по фармация, МУ-Плевен

INVOLVEMENT OF THE NITRICOXIDERGIC SYSTEM IN THE ANALGESIC EFFECTS OF NEWLY SYNTHESIZED NOCICEPTIN ANALOGUES AFTER CHRONIC IMMOBILIZATION STRESS

Ivelina Himcheva¹, Galya Stavreva², Armine Grigorian¹, Aneliya Dimitrova¹,
Adriana Bocheva¹

¹Department of Physiology and Pathophysiology, Faculty of Medicine,
Medical University of Pleven

²Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy,
Medical University of Pleven

РЕЗЮМЕ

Стресът е сред причините за редица нерв-но-психични заболявания. При стрес в резултат от сложното взаимодействие между ендокринната, имунната и централната нервна система се наблюдават функционални и структурни промени в организма. Променят се болковата перцепция и поведенческите отговори. Аналгезията, индуцирана от стрес, може да бъде предизвикана от различни стресори. Стресът предизвиква стрес-индуцираната аналгезия (СИА).

Ноцицептин/орфанин FQ (N/OFQ) е невропептид със 17-аминокиселинна последователност, който повлиява ноцицепцията. Ноцицептин и аналозите са невропептиди, невромодулатори, които намаляват различните форми на стрес-индуцираната аналгезия.

Азотният оксид (NO) има важна роля в болковата перцепция. Известно е, че повлиява ноцицепцията при остър и хроничен стрес. Следователно, опиоидните невропептиди и NO медираат ноцицепцията и СИА.

Целта на изследването беше изучаване участието на нитрикоксаидергичната система в аналгетичните ефекти на нови N-модифицирани ноцицептинови аналози N/OFQ(1-13)NH₂ -

ABSTRACT

Stress is known to exert an influence on neuroendocrine, autonomic, hormonal, and immune functioning. Various stress models have been reported to induce analgesia. This is a phenomenon referred to as stress-induced analgesia (SIA). Nociceptin and analogues are neuropeptides, neuromodulators, which are able to inhibit the expression of some forms of SIA. Nociceptin/orphanin FQ(N/OFQ) is a heptadecapeptide, which has been found to play a direct role on pain perception.

Nitric oxide (NO) plays an important role in the initiation and maintenance of pain. It is also known that acute and chronic stress induce biochemical changes affecting both pain threshold and behaviour. Thus, endogenous opioid peptides and NO mediate a wide variety of physiological processes, including pain transmission and SIA.

The aim of the present study was to investigate the effects of novel analogues of N/OFQ(1-13)NH₂, where lysine (Lys) at position 9 and/or 13 was substituted by L-ornithine (Orn) on nociception after chronic immobilization stress (IS) and the involvement of the nitric oxideergic systems in these effects. Analgesic activity was examined by nociceptive test – paw-pressure (PP). All novel analogues of N/OFQ were injected at

[Orn⁹,Orn¹³]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ след хроничен имобилизационен стрес.

Експериментите бяха проведени върху мъжки плъхове, порода Wistar (180-200g.), със свободен достъп на вода и храна, при температура 22 ± 2°C.

Промените в болковата активност бе оценена с прилагане на механично дразнене - raw pressure (PP) тест. Изследваните субстанции бяха въвеждани интраперитонеално (i.p.). Ноцицептин и аналозите бяха инжектирани в доза 10 µg/kg, L-NAME - 10 mg/kg и L-arginine (L-arg) - 1mg/kg, 10 мин след имобилизационния хроничен стрес. Контролната група бе инжектирана с физиологичен разтвор в обем 0,1 ml/kg (i.p.). Експерименталните данни бяха обработени статистически чрез ANOVA.

Получените резултати показаха, че в анализите ефекти на новите ноцицептинови аналози участва азотноокисната невротрансмитерна система след хроничен имобилизационен стрес.

Ключови думи: ноцицептин и аналози, хроничен имобилизационен стрес, L-arginine, L-NAME, ноцицепция

ВЪВЕДЕНИЕ

Известно е, че азотноокисната и други невротрансмитерни системи участват в модулацията на низходящата антиноцицептивна система (9,17,18).

Азотният оксид (NO) се получава от L-аргинин под действието на специфична невронална и не-невронална форма на NO-синтеза (nNOS и ендотелиална eNOS или индицируема iNOS) (7,17,18). Той е ангажиран в редица физиологични и патофизиологични процеси (7,17,18), като модулира болковата перцепция при остра и хронична болка (3) на централно и периферно ниво (8,15).

Известно е, че NO участва в множество механизми в централната сензитизация (11), потенцира освобождаването на субстанция P и други субстанции от терминалите на C-влакната (13), което повишава хипералгезията.

Проведените допълнителни изследвания с активатори и инхибитори на различните ензими, участващи в образуването и разграждането на NO, потвърждават, че той предизвиква *per se*, т.е. сам по себе си аналгезия и този ефект зависи от вътреклетъчен сигнален път, включващ образуване на цГМФ (6). L-аргининът (прекурсор на

a dose of 10 µg/kg, NG-nitro-L-arginine methylester (L-NAME, 10 mg/kg) and L-arginine (L-arg, 1 mg/kg). All drugs were dissolved in saline and were injected intraperitoneally (i.p.). The nociceptive tests were performed 10 min after peptide injection. Antinociceptive effects were statistically accessed by ANOVA.

In conclusion, we suggest that the nitricoxidergic system after chronic immobilization stress is involved in the analgesic effects of the novel analogues of nociceptin.

Keywords: nociceptin analogues, chronic immobilization stress, L-arginine, L-NAME, nociception

NO) и SIN-1 (донор на NO), инжектирани вътре-церебровентрикуларно на мишка, предизвикват антиноцицепция. Ефектът е медиран от диноρφин и е зависим от NO, което се доказва от антагонизирането му с налоксон и потискането му от инхибитори на nNOS (4). Азотният оксид участва в десцендентния инхибиторен контрол на болката в ЦНС (14).

Наши резултати показаха промени в аналгезията, предизвикана при интраперитонеално въвеждане на инхибитора на NO-синтезата L-NAME, както и аналгезията при едновременно имобилизационен и студов стрес (1).

В ЦНС се синтезират и освобождават молекули, които могат да бъдат квалифицирани като антиопиоиди. Антиопиоидни свойства притежават различни пептиди – ноцицептин, невропептид FF, холецистокини, които не упражняват само антиопиоидно действие, но и оказват морфиномиметични ефекти, които се антагонизират от налоксон (2).

В последните години голям интерес представляват изследванията структура-активност на ноцицептин - NOP-рецептора (5,16), разпространени в централната и периферната нервна сис-

тема, както и в различни участъци на мозъчната кора, хипоталамуса, симпатиковите неврони, мозъчния ствол, гръбначния мозък (10,19).

Специфичното разположение на NOP-рецептора и ноцицептина в мозъка показва участието им в модулирането на множество процеси, контролирани от централната нервна система (10,19). Ноцицептинът оказва влияние върху болката, страха, апетита, двигателната активност, обучението и паметта (12). В периферната нервна система ноцицептинът повлиява сърдечностъдовите, гастроентерологичните, урологичните и дихателните функции.

В литературата до този момент няма данни за механизмите, лежащи в основата на аналгезията, предизвикана от ноцицептин и аналози, след хроничен имобилизационен стрес.

Ето защо целта на изследването беше изучаване участието на нитрикоксидергичната система в аналгетичните ефекти на нови N-модифицирани ноцицептинови аналози N/OFQ(1-13)NH₂ - [Orn⁹,Orn¹³]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ след хроничен имобилизационен стрес

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Експериментите бяха проведени върху мъжки плъхове, порода Wistar (180-200g). Животните бяха отглеждани по 10–15 броя в полипропиленови клетки със свободен достъп на вода и храна, при температура 22±2°C.

Изследваните субстанции бяха въведени интраперитонеално (i.p.). Ноцицептин и аналозите бяха инжектирани в доза 10 µg/kg, L-NAME, 10 mg/kg и L-arginine (L-arg), 1mg/kg след имобилизационния хроничен стрес. Контролната група бе инжектирана с физиологичен разтвор в обем 0,1 ml/kg (i.p.).

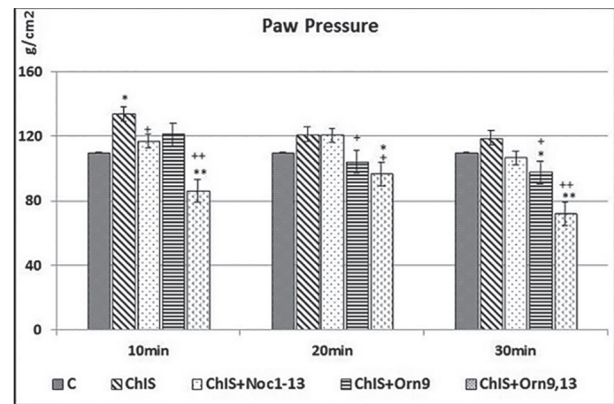
За оценка на болката беше използван метод с прилагане на механично дразнене - Paw pressure (PP) тест.

Експерименталните данни бяха обработени статистически с програма Statgraphics Centurion XVII. Междугруповите различия са сравнени с помощта на One Way Anova тест. За всеки показател са определени средна аритметична стойност и стандартната грешка (±SEM).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

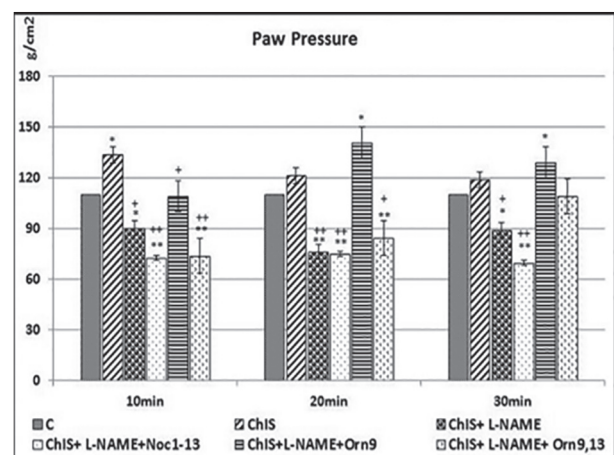
Хроничният имобилизационен стрес повиши прага на болката при експерименталните животни на 10 минути от изследването в сравнение с контролите (фиг. 1).

Ноцицептин и аналозите [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Orn⁹,Orn¹³]N/OFQ(1-13)NH₂, статистически достоверно понижиха болковия праг в сравнение с животните след хроничен имобилизационен стрес (фиг. 1).



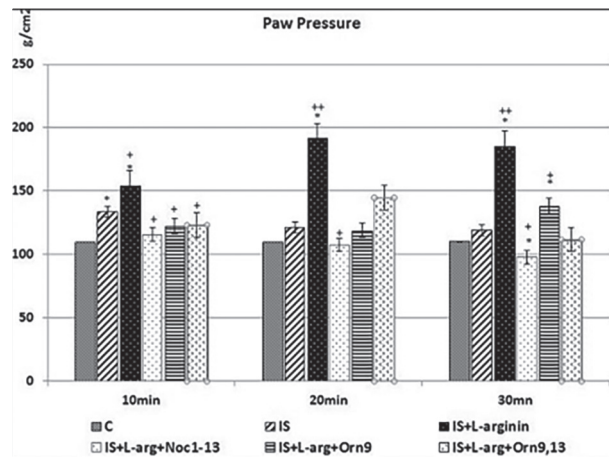
Фиг. 1. Ефекти на ноцицептин и аналозите (в доза 10 µg/kg, i.p.) върху болковия праг след хроничен имобилизационен стрес (ChIS), измерен чрез PP-теста. Данните са представени като средни стойности ±S.E.M.; *p<0.05; **p<0.01 спрямо контролата и *p<0,05; **p<0.01 спрямо ChIS.

L-NAME (10 mg/kg, i.p.) бе инжектиран 20 минути преди аналозите и ноцицептина. При съвместното въвеждане на L-NAME с ноцицептин и аналозите се наблюдаваше статистически достоверно понижаване на болковия праг, който е по-изразен за [Orn⁹, Orn¹³]N/OFQ(1-13)NH₂ в сравнение с [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и хроничния имобилизационен стрес (фиг. 2).



Фиг. 2. Ефекти на ноцицептин и аналози (в доза 10 µg/kg, i.p.) при съвместното им въвеждане с L-NAME върху болковия праг, измерен чрез PP-теста, след хроничен имобилизационен стрес (ChIS). Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.; *p<0.05; **p<0.01 спрямо контролата и *p<0,05; **p<0.01 спрямо ChIS.

Ноцицептинът и аналозите $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, $[\text{Orn}^9, \text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, въведени съвместно с L-arg след хроничния имобилизационен стрес, понижиха статистически достоверно болковия праг в сравнение с животните след хроничен имобилизационен стрес (фиг. 2).



Фиг. 3. Ефекти на ноцицептин и аналозите (в доза $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) и тяхната комбинация с L-arg върху болковия праг, измерен чрез PP-теста, след хроничен имобилизационен стрес (ChIS). Данните са представени като средни стойности \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ спрямо контролата и $^+p < 0,05$; $^{++}p < 0.01$ спрямо ChIS.

Известно е, че аналгезията, индуцирана при стрес, е феномен, наречен стрес-индуцирана аналгезия (СИА), която може да бъде предизвикана чрез имобилизация, излагане на ниска или висока температура, принудително плуване и др. (1,10).

При стрес-индуцираната аналгезия участват редица медиаторни и невротрансмитерни системи – опиоидергична, азотноокисна, адренергична, серотонинергична, ендоканабиноидна и др. (8,9,16).

Азотният оксид има роля в модуляцията на болковата перцепция при остра и хронична болка (3) както на централно, така и на периферно ниво (8). Той дифундира извън неврона и действа върху нервните окончания на астроцитите като невротрансмитер. Освен това потенцира освобождаването на субстанция P и други субстанции от терминалите на C-влакната (13), което повишава хипералгезията.

Съществуват данни, че NO индуцира аналгезия и медира централния и периферен ефект на някои аналгетични субстанции

като опиоидни пептиди, НСПВС, природни продукти (6).

Азотният оксид има сложна и отчасти противоречива роля в модуляцията на болковата перцепция. Така например L-аргининът (прекурсор на NO) и SIN-1 (донор на NO), инжектирани icv на мишка, предизвикват антиноцицепция. Ефектът е медиран от динорфин и е зависим от NO, което се доказва от антагонизирането му от налоксон и потискането му от инхибитори на nNOS (4).

Както е известно от литературните данни, в ЦНС се синтезират и освобождават антиопиоиди. Ноцицептинът притежава антиопиоидни ефекти, които се антагонизират от налоксон (2).

Наши предишни резултати са в подкрепа на литературните данни, че антиопиоидните пептиди модулират редица невротрансмитерни системи (1,2,4,10,12).

В нашите опити ноцицептинът и новите аналози - $[\text{Orn}^9, \text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, модулират аналгетичните ефектите на азотноокисната система след хроничен имобилизационен стрес.

ИЗВОДИ

За първи път са получени оригинални резултати за връзката между новите N-модифицирани аналози на ноцицептин $\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ и азотноокисната система след хроничен имобилизационен стрес.

Новосинтезираният аналог на $\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, при който Lys на 9-а и 13-та позиция е заместен с L-ornithine, потиска по-силно статистически достоверно болковия праг, в сравнение с този на $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ след хроничен имобилизационен стрес.

Съвместното въвеждане на пептидите с N^G -nitro-L-arginine methylester (L-NAME) и с L-arginine показва статистически достоверно понижение на болковия праг.

Получените резултати потвърждават, че в аналгетичните ефекти на новите ноцицептинови аналози участва азотноокисната невротрансмитерна система след хроничен имобилизационен стрес.

Благодарности

Настоящият труд бе реализиран с подкрепата на Проект 10/2020 г., финансиран от Медицински университет - Плевен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bocheva A, Dzambazova-Maximova E, Lambadjieva N. Interaction between peptides of Tyr-MIF-1 family, morphine and nitric oxide in nociception. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*. 2004; 57(3):3-97.
2. Cesselin F. Opioid and anti-opioid peptides. *Fundamental & clinical pharmacology*. 1995; 9(5):409-433.
3. Chen Y, Boettger K, Reif A, Schmitt A, Uceyler N, Sommer C. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. *Mol. Pain*. 2010; 6-13.
4. Chung E, Burke B, Bieber AJ, Doss JC, Ohgami Y, Quock R.M. Dynorphin-mediated antinociceptive effects of L-arginine and SIN-1 (an NO donor) in mice. *Brain Res Bull*. 2006; 70(3):245-500.
5. Danalev DL, Stanislava PV, Borislav PB, Hristina HN, Bocheva A, Marinkova DA, et al. Synthesis and Analgesic Activity of New Analogues of Tyr-MIF Including Pyrrole Moiety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2016; 22(2):243-248.
6. Duarte ID, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol*. 1990; 289-293.
7. Esplugues JV. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br. J. Pharmacol*. 2002; 135:1079-1095.
8. Freire MA, Guimaraes JS, Leal WG, Pereira A. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. *Front. Neurosci*. 2009; 3:175-181.
9. Hill KP, Palastro MD, Johnson B, Ditre JW. Cannabis and pain: a clinical review. *Cannabis and cannabinoid research*. 2017; 2(1):96-104.
10. Khan MS, Boileau I, Kolla N, Mizrahi R. A systematic review of the role of the nociceptin receptor system in stress, cognition, and reward: relevance to schizophrenia. *Translational psychiatry*. 2018; 8(1):1-12.
11. Little JW, Doyle T, Salvemini D. Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain. *Amino Acids*. 2010; 42(1):75-94.
12. Mallimo EM, Kusnecov AW. The role of orphanin FQ/nociceptin in neuroplasticity: relationship to stress, anxiety and neuroinflammation. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2013; 7:173.
13. Miculescu A, Gordh T. Nitric oxide and pain: 'Something old, something new'. *Acta Anaesthesiol. Scand*. 2009; 53(9):1107-1120.
14. Millan MJ. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol*. 2002; 66(6): 355-474
15. Miyamoto T, Dubin AE, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS one*. 2009; 4.10: e7596.
16. Nocheva H, Naydenova E, Pavlov N, Bocheva A. Effects of nociceptin neurotransmitter system on nociception in 6-hydroxydopamine model of hemiparkinsonism in rat. *Bulgarian Chemical Communications*. 2017; 49:151-158.
17. Olson N, Vliet A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide*. 2011; 25(2):125-137
18. Paradise WA, Vesper BJ, Goel A, Waltonen JD, Altman KW, Haines GK, et al. Nitric oxide: perspectives and emerging studies of a wellknown cytotoxin. *International journal of molecular sciences*. 2010; 11.(7): 2715-2745.
19. Zhang Y, Schalo I, Durand C, Standifer KM. Sex Differences in Nociceptin/Orphanin FQ Peptide Receptor-mediated pain and anxiety symptoms in a preclinical model of post-traumatic stress disorder. *Frontiers in psychiatry*. 2018; 9:731.

Адрес за кореспонденция:

Ивелина Иванова Химчева
 Катедра „Физиология и патофизиология“
 ул. „Св. Климент Охридски“ 1
 Плевен, 5800
 e-mail: himcheva7@abv.bg