



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

NEUROSCIENZE

Ciclo XXIII

**Caratterizzazione farmacologica di nuovi composti oppioidi
per la terapia del dolore**

BIO/14 FARMACOLOGIA AREA 05 SCIENZE BIOLOGICHE

Presentata da: Carla Pisu

Coordinatore Dottorato Prof.ssa Alessandra Concas

Relatore Prof. Giovanni Biggio

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

INDICE	
INTRODUZIONE	4
<i>Il dolore</i>	4
<i>Le vie del dolore</i>	5
<i>Sistema oppioide e regolazione del dolore</i>	6
<i>Terapia del dolore</i>	8
<i>Analgesici oppioidi</i>	9
<i>Tolleranza e dipendenza fisica</i>	9
<i>Addiction</i>	10
<i>Dopamina effetto gratificante e addiction</i>	11
<i>Sistema noradrenergico e crisi d'astinenza</i>	11
OBIETTIVI	13
SINTESI	14
AFFINITA' RECETTORIALE	16
<i>Risultati</i>	17
VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' SUI RECETTORI μ	17
<i>Western Blotting</i>	18
<i>Risultati</i>	19
DRUG DELIVERY	21
<i>Materiali</i>	21
<i>Metodo di preparazione</i>	21
ANALGESIA	22
<i>Tail-flick e Hot-plate</i>	22
<i>TailFlick</i>	22
<i>Hot-plate</i>	25
<i>Test della formalina</i>	30
<i>Dolore neuropatico</i>	34

<i>Spared nerve Injury</i>	35
MICRODIALISI	38
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	45
BIBLIOGRAFIA	49

Introduzione

Il dolore

L'Associazione internazionale per lo studio del dolore (IASP) definisce il dolore come " un'esperienza sensoriale e emotiva spiacevole dovuta ad un danno tissutale effettivo o potenziale" (Fishbain et al. 2010).

Il dolore presenta una componente percettiva, ossia la nocicezione in senso stretto attraverso il quale la percezione di uno stimolo negativo e lesivo per l'organismo viene trasmesso al sistema nervoso centrale, e una componente affettiva del tutto soggettiva, ossia la percezione psichica del dolore, che può essere più o meno intensa in funzione dello stato emotivo dell'individuo.

Una definizione più specifica di dolore viene data in base alla sua persistenza e in relazione alle cause fisiche e psicologiche che lo determinano. Una prima distinzione può essere fatta in dolore acuto e dolore cronico.

In generale il dolore acuto è un meccanismo di difesa innescato da cause fisiche specifiche, ha breve durata e termina nel momento in cui la lesione viene risolta o l'agente nocicettivo viene allontanato.

Il dolore cronico è invece un dolore persistente che dura più a lungo della lesione tissutale che lo causa.

In base alla causa scatenante, il dolore viene definito nocicettivo, neuropatico, infiammatorio, funzionale, somatoforme o esistenziale.

Il dolore nocicettivo può essere causato da uno stimolo termico, chimico o meccanico.

Il dolore neuropatico, causato da una lesione o da un malfunzionamento della trasmissione nervosa, può essere provocato da un firing neuronale ectopico a livello del soma o degli assoni, oppure può essere causato dal rilascio di peptidi in seguito a una lesione di un nervo contribuendo in questo modo alla risposta infiammatoria, oppure può essere causato dall'inibizione dei sistemi neuronali coinvolti nella trasmissione e nella modulazione degli stimoli periferici.

Il dolore infiammatorio fa riferimento a un dolore spontaneo e a una ipersensibilità dovuta a un danno tissutale o a infiammazione. I nervi delle vie afferenti sensoriali sono infatti sensibili ai mediatori dell'infiammazione quali bradichinine, prostaglandine e leucotrieni che possono attivare direttamente i nocicettori o intensificare l'infiammazione attraverso il reclutamento di cellule infiammatorie. La stimolazione dei neuroni afferenti da parte delle sostanze infiammatorie può causare sensitizzazione periferica e centrale e una variazione della funzionalità neuronale che può tradursi in dolore cronico.

Non sempre però si può fare una distinzione netta tra dolore cronico di tipo infiammatorio e di tipo neuropatico, le componenti tipiche di un processo infiammatorio cronico possono infatti presentarsi e diventare parte integrante dei meccanismi che regolano il dolore neuropatico, dato che spesso l'infiammazione può causare danni ai neuroni e produrre a sua volta dolore neuropatico. Allo stesso

modo, le lesioni neuronali possono causare una reazione infiammatoria (infiammazione neurogena) che contribuisce al manifestarsi di un dolore infiammatorio. Quindi un'attenta analisi della sintomatologia e della patofisiologia in atto dovrebbe essere considerata fondamentale per una corretta terapia.

Il dolore funzionale (non nocicettivo, e non neuropatico) può essere dovuto ad un aberrante funzionamento del sistema nervoso nell'elaborazione e nella risposta allo stimolo doloroso che si traduce in iperalgesia e allodinia. L'iperalgesia implica sia la sensibilizzazione delle terminazioni nervose nocicettive periferiche sia la facilitazione della trasmissione centrale. Questo fa sì che stimoli di lieve entità diano luogo a risposte dolorose molto intense. Un importante fenomeno che causa l'ipersensibilità è il "wind up". In seguito a stimolazione ripetuta i neuroni rispondono con un continuo aumento nella frequenza di firing che persiste anche in assenza dello stimolo.

Il dolore somatoforme ha una forte componente psicologica. I pazienti con dolore somatoforme lamentano dolore in una o più aree senza che sia presente una causa medica rilevabile. Questa forma di dolore è spesso accompagnata da manifestazioni ansiose e spesso ha ricadute sulla vita sociale del paziente (Manchikanti et al. 2010; Christo et al. 2008; Omoigui et al. 2007)

Le vie del dolore

Via ascendente

Le sensazioni dolorose originano nei nocicettori periferici. I nocicettori sono dei neuroni con i terminali liberi situati perifericamente sotto cute e negli organi interni. Si tratta di recettori a soglia elevata, attivati da stimoli di intensità sufficiente a causare un danno tissutale. In genere nelle lesioni tissutali vengono liberate delle sostanze endogene in grado di stimolare i nocicettori periferici (sostanza P, bradichinina, serotonina, istamina). Si possono distinguere nocicettori meccanici, attivati da stimolazioni molto intense (come oggetti appuntiti), nocicettori termici attivati da temperature superiori a 45°C e nocicettori polimodali attivati da tutti i tipi di stimoli. Lo stimolo doloroso viene poi trasmesso al sistema nervoso centrale attraverso le fibre afferenti primarie. Si tratta di fibre di piccolo calibro che possono essere non mielinizzate e a conduzione lenta (fibre C) o mielinizzate e a conduzione più rapida (fibre A δ). I corpi cellulari delle fibre afferenti spinali sono localizzati nei gangli delle radici dorsali. Esse entrano nel midollo spinale attraverso le radici posteriori e terminano nella sostanza grigia delle corna posteriori. Le fibre C terminano negli strati più superficiali a livello della lamina I e II, mentre le fibre di tipo A vanno a innervare i corpi cellulari posti più in profondità fino alla lamina V. Dai corpi cellulari dei neuroni della lamina I e V originano le fibre ascendenti che vanno a innervare il talamo (fascio spinotalamico ipsilaterale e contro laterale) in particolare talamo ventrale e mediale, da cui poi originano fibre che vanno a innervare la corteccia somatosensoriale. L'informazione somato-sensitiva viene trasmessa alla corteccia cerebrale da due principali sistemi ascendenti: il sistema laterale (media

sensibilità, termica e tattile fine) e il sistema mediale (media sensibilità tattile e propriocettiva più diffusa). Del sistema laterale fa parte il tratto spino-talamico. Questo tratto rappresenta una via rapida di conduzione del dolore: proietta direttamente al talamo ed è responsabile degli aspetti sensoriali discriminativi del dolore. Del sistema mediale fa parte il tratto spino-reticolo-talamico, che è un sistema a più lenta velocità di conduzione che proietta alla formazione reticolare del tronco encefalico e successivamente al talamo; questa via codifica il dolore diffuso e meno localizzabile. La percezione del dolore finale è dovuta alla trasmissione nocicettiva da parte del talamo alla corteccia sensitiva mediante l'eccitazione di fibre neuronali talamo-corticali. L'elaborazione della percezione dolorosa coinvolge inoltre le strutture pre-frontali, frontali e limbiche (amigdala e ippocampo) in tal modo alla percezione cosciente derivante dagli input sensitivi periferici si sovrappongono le componenti cognitive ed affettive.

Le cellule delle lamine II e III delle corna dorsali (sostanza gelatinosa SG) sono interneuroni inibitori che innervano le lamine I e V. Si tratta di interneuroni ricchi di peptidi oppioidi e di recettori oppioidi che attivati dalla via inibitoria discendente regolano la trasmissione tra le fibre afferenti primarie e i neuroni del tratto spino talamico.

Via discendente

Le vie discendenti costituiscono uno dei meccanismi di controllo della trasmissione dell'impulso nelle corna dorsali. Un'area fondamentale nel controllo discendente del dolore è rappresentata dall'area grigia periacquedottale (PAG). La PAG è un'area ricca di peptidi oppioidi che riceve afferenze da diverse aree cerebrali quali ipotalamo corteccia e talamo. Dal PAG originano delle fibre che innervano un'area del midollo allungato chiamata nucleus raphe magnus (NRM) ricca di neuroni serotoninergici. Da qui le fibre corrono nel funicolo dorso-laterale del midollo spinale e terminano in sinapsi con gli interneuroni della SG che a loro volta inibiscono la via spinotalamica. Il neurotrasmettitore principale in questa via è la serotonina. Il NRM a sua volta riceve l'innervazione dei neuroni spinotalamici tramite l'adiacente nucleus reticularis paragigantocellularis (NRPG) creando un sistema a feedback in cui la trasmissione attraverso le corna dorsali viene controllata dall'entità dell'attività che raggiunge il talamo.

Un'altra area fondamentale nel controllo discendente è il locus coeruleus da cui originano fibre noradrenergiche che vanno a innervare le corna dorsali.

Sistema oppioide e regolazione del dolore

Sono state identificate quattro diverse famiglie di peptidi oppioidi classici: le encefaline, le endorfine, le dinorfine e le endomorfine. Tutti i peptidi oppioidi contengono una sequenza aminoacidica amino terminale identica (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met o Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) che è stata chiamata "motivo oppioide".

I neuropeptidi oppioidi derivano dalla digestione endopeptidasica di precursori polipeptidici. Quelli attualmente noti sono la pre-oppiomelanocortina (POMC) la pre-encefalina e la pre-dinorfina.

Dal taglio enzimatico di POMC derivano fino a 23 peptidi di cui solo alcuni hanno proprietà oppioidi, mentre gli altri sono affini all'ormone adrenocorticotropo (ACTH) o all'ormone melanotropo (MSH). Questa associazione implica uno stretto legame fisiologico tra l'asse dello stress e la via oppioide, confermato dall'esistenza della analgesia indotta da stress.

I peptidi oppioidi derivati da POMC sono fondamentalmente la β endorfina (frammento 235-265 del POMC) e frammenti di quest'ultima.

Il precursore pre-encefalina contiene sei copie di met-encefalina e una copia di leu-encefalina mentre la pre-dinorfina da origine alla dinorfina A, dinorfina B e α e β neoendorfina. Attualmente non si conosce il gene che codifica per le endomorfine.

Nel sistema nervoso centrale (SNC) la β endorfina è localizzata principalmente nel nucleo arcuato e nel nucleo del tratto solitario. Dai neuroni contenenti POMC originano proiezioni brevi che terminano nell'ipotalamo e proiezioni più lunghe che terminano nel setto ventrale, nel nucleo accumbens, nel talamo mediale, nell'amigdala, nella PAG, nel locus coeruleus e nella formazione reticolare pontobulbare.

I derivati della pre-encefalina hanno una vasta distribuzione nel SNC, nei plessi nervosi periferici e nella sostanza midollare del surrene. Nel SNC le encefaline sono contenute prevalentemente in interneuroni con assoni brevi in aree coinvolte nella percezione e nella trasmissione del dolore (lamina I e II del midollo spinale, nucleo spinale del trigemino, PAG), nella modulazione del comportamento affettivo e della memoria (nucleo accumbens, amigdala, ippocampo e corteccia cerebrale), e in aree motorie (substanza nigra e nucleo caudato).

La distribuzione anatomica delle dinorfine è simile a quella delle encefaline anche se le popolazioni neuronali sono spesso differenti. Le dinorfine si trovano nella lamina II del midollo spinale, nel nucleo ipotalamico anteriore, nel caudato, nell'ippocampo e nella corteccia.

La distribuzione anatomica delle endomorfine è in accordo con quella dei recettori oppioidi di tipo μ . Sono state identificate nelle corna dorsali del midollo spinale, nel setto, nei nuclei talamici, nel nucleo accumbens, nella PAG e nel locus coeruleus. A differenza degli altri peptidi oppioidi endogeni, poco selettivi per i tre recettori oppioidi, le endomorfine presentano elevata affinità per i recettori di tipo μ .

Un peptide correlato alle dinorfine, più per ragioni strutturali che funzionali, è la nocicettina (detta anche orfanina). La nocicettina modula la percezione del dolore in maniera complessa variando dall'iperalgisia all'analgesia, all'allodinia spinale. E' localizzata prevalentemente negli strati superficiali delle corna dorsali, nella PAG e nel nucleo del raphe.

L'attività dei peptidi oppioidi è mediata da tre diversi tipi di recettori identificati come: μ , κ e δ . Il recettore per la nocicettina ha un'elevata omologia di sequenza con i recettori per gli oppioidi, ma non lega i ligandi oppioidi classici.

I recettori μ , κ e δ appartengono alla super famiglia di recettori associati a proteine G.

Attraverso $G_{i/o}$ modulano in senso inibitorio la cascata di trasduzione del segnale adenil- ciclasi, AMP ciclico, protein chinasi C (PKC). Gli oppioidi tendono ad inibire la trasmissione neuronale e quindi anche la trasmissione degli stimoli nocicettivi. La stimolazione dei recettori oppioidi presinaptici riduce il rilascio di neurotrasmettitori attraverso l'inibizione dei canali al calcio (Ca^{++}) di tipo N, mentre a livello post sinaptico determina iperpolarizzazione mediata da stimolazione dei canali al potassio (K^+) e inibizione dei canali al Ca^{++} di tipo L.

La distribuzione dei recettori oppioidi nel SNC spiega il loro ruolo fisiologico e gli effetti farmacologici degli agonisti oppioidi. In generale si ritiene che l'analgesia soprasspinale sia mediata prevalentemente dai recettori di tipo μ con un ruolo marginale dei recettori di tipo δ , mentre l'analgesia spinale coinvolga tutti e tre i tipi recettoriali (Golembiewski e Rakic 2010; Bruijnzeel 2009; Przewlocki et al. 2001).

Terapia del dolore

Il dolore acuto non rappresenta in generale un problema clinico rilevante in quanto risponde adeguatamente al trattamento con farmaci oppioidi o con antiinfiammatori non steroidei (FANS).

Il trattamento del dolore cronico risulta invece decisamente più problematico. Un corretto approccio terapeutico deve tener conto della forte componente emotiva e soggettiva che caratterizza questo tipo di patologia. L'azione terapeutica non può quindi essere rappresentata soltanto dalla applicazione di protocolli e linee guida per la terapia antalgica, ma deve prendere in considerazione il contesto generale di sofferenza della persona.

Negli USA si stima che il dolore cronico colpisca circa 68 milioni di persone di ogni età, di cui il 25% (17,5 milioni) sono anziani. Il dolore cronico viene riferito da almeno il 50% della popolazione con più di 64 anni con un'incidenza del 60% tra quelli con più di 75 anni (Pergolizzi et al, 2008).

Un recente studio (2008) della "Associazione Italiana per la cura della malattia dolore" indica che oggi in Italia oltre il 20% delle persone soffrono per lunghi periodi della vita di sindromi dolorose conseguenti a patologie croniche non neoplastiche. Da questo studio, risulta inoltre che il dolore cronico è la seconda causa di assenteismo dal lavoro dovuto a cause mediche (Pergolizzi et al, 2008).

L'impatto del dolore cronico sui pazienti, sui familiari e sui professionisti è enorme; esso può condurre ad una prolungata inabilità al lavoro, problematiche psicologiche, e frequente ricorso a visite mediche e prescrizioni. Il 50% dei pazienti con dolore cronico soffre di depressione, mentre disturbi ansiosi sono stati riscontrati nel 40% dei soggetti affetti da dolore cronico. (Breivik et al, 2006).

Attualmente i farmaci più prescritti risultano essere gli analgesici classici quali FANS (antiinfiammatori non steroidei) e gli oppioidi.

I FANS possiedono proprietà antiflogistiche, antipiretiche ed analgesiche e costituiscono il fondamento del trattamento delle condizioni infiammatorie croniche. La loro azione è dovuta all'inibizione delle cicloossigenasi e di conseguenza alla inibizione della sintesi di prostaglandine che modulano i processi infiammatori.

I FANS sono indicati, in ambito reumatologico, nel trattamento del dolore associato ad artropatie di natura flogistica quali l'artrite reumatoide, l'artrosi e i dolori muscolo-scheletrici. Complessivamente i FANS hanno un buon livello di sicurezza ma, a causa delle enormi quantità prescritte producono un gran numero di eventi avversi. Le complicanze più frequenti si manifestano a livello gastrico, renale, polmonare e piastrinico. I FANS in generale sono dunque farmaci di comprovata efficacia sia nel dolore acuto che nel dolore cronico di natura flogistica mentre sono minime le prove di efficacia sul dolore neuropatico.

Analgesci oppioidi

L'uso degli oppioidi nella terapia del dolore sia acuto che cronico risale al 3400 a.c. Attualmente gli oppioidi rappresentano i farmaci più prescritti per il trattamento del dolore. L'azione analgesica degli oppioidi è mediata dai recettori μ , δ e κ situati sia nel cervello che nel midollo spinale.

Gli oppioidi vengono attualmente utilizzati per il trattamento del dolore acuto, del dolore post operatorio e nelle cure palliative. L'utilizzo degli oppioidi nel trattamento del dolore cronico è invece motivo di discussione, infatti si sono rivelati efficaci soltanto in trials clinici di breve durata mentre mancano evidenze sperimentali a supporto di una loro efficacia in trattamenti prolungati come quelli richiesti nel trattamento del dolore cronico (Manchikanti et al. 2010).

L'uso degli oppioidi è caratterizzato dalla comparsa di effetti collaterali piuttosto rilevanti quali depressione respiratoria, sedazione, nausea e costipazione. Con l'uso prolungato si osserva la comparsa di effetti collaterali diversi e ancora più gravi quali dipendenza fisica e tolleranza all'effetto analgesico, dovuti a meccanismi omeostatici adattativi che danno origine a una sindrome d'astinenza quando il farmaco viene bruscamente interrotto, e che possono causare "addiction" e abuso (Bekhit et al. 2010; Ballantyne e Shin 2008; Benyamin et al. 2008; Grecksch et al. 2006; Liu e Anand 2001).

Tolleranza e dipendenza fisica

La tolleranza è la riduzione dell'effetto di un farmaco conseguente all'uso prolungato. La tolleranza all'effetto analgesico degli oppioidi determina la necessità di aumentare la dose somministrata per

ottenere lo stesso effetto analgesico (Bekhit et al. 2010; Ballantyne e Shin 2008; Benyamin et al. 2008; Grecksch et al. 2006; Liu e Anand 2001).

La somministrazione acuta di oppioidi determina inibizione dell'adenil ciclasi e una riduzione dei livelli di AMP ciclico (cAMP), che si traduce in una ridotta funzionalità della protein chinasi A (PKA) e della fosforilazione di target citoplasmatici e nucleari quali ad esempio CREB (cAMP-responsive element-binding protein). Attraverso i recettori μ , δ e κ gli oppioidi possono anche indurre la fosforilazione e quindi attivazione di CREB attraverso la via delle MAP- chinasi (mitogen-activated protein) (Chen et al.2010; Wang e Sadee 2000; Gudstein et al. 1997; Lane-Ladd et al.1997). Alcuni studi suggeriscono che l'insorgenza di tolleranza sia dovuta ad una riduzione dei recettori per gli oppioidi. La stimolazione continua desensitizzerebbe tali recettori che vengono fosforilati da chinasi accoppiate a proteine G; la β arrestina legherebbe poi questi recettori fosforilati causandone l'internalizzazione (Koonse et al. 2007; Camì et al.2003). In realtà i meccanismi molecolari alla base della tolleranza non sono ancora stati chiariti, infatti l' effetto analgesico della morfina va incontro a tolleranza ma il legame con i recettori non ne determina l'internalizzazione (Whistler et al. 1998).

I risultati ottenuti in diversi studi preclinici suggeriscono che l'uso prolungato di oppioidi determini non soltanto una riduzione dell'efficacia all'effetto analgesico, indicativo quindi di una desensitizzazione, ma anche l'attivazione di un sistema pro-nocicettivo che determina iperalgesia. Questa condizione risulta particolarmente evidente quando il farmaco viene sospeso e spiega la comparsa dei sintomi d'astinenza (Benyamin et al. 2008; Mao et al. 1995).

La dipendenza fisica è infatti la manifestazione di meccanismi adattativi compensatori in aree cerebrali che controllano le funzioni somatiche, in particolare per gli oppioidi il locus coeruleus, che si traduce in una tipica crisi di astinenza quando la somministrazione del farmaco viene bruscamente interrotta.

I sintomi dell'astinenza da oppioidi sono: iperalgesia, insonnia, irritabilità, agitazione psicomotoria, diarrea rinorea e piloerezione . Questa sintomatologia sembra essere dovuta principalmente ad aumento dell'attività dell' AMP ciclico e del sistema noradrenergico che origina nel locus coeruleus (Ballantyne e Shin 2008).

Addiction

Con il termine di "addiction" si intende un disturbo cronico a rischio di ricaduta caratterizzato da compulsione nella ricerca e nell'assunzione del farmaco, perdita di controllo nel limitare l'assunzione nonostante i rischi evidenti, e l'insorgenza di stati emotivi negativi (disforia, ansia e irritabilità) quando l'assunzione viene impedita. Nell' addiction si osserva quindi la perdita di controllo nell' assunzione di una sostanza (Carinci e Mao 2010).

L'addiction può non essere esclusivamente conseguenza degli effetti collaterali, ma essere causata dagli stati emotivi negativi associati al dolore cronico (Shurman et al. 2010) e indipendenti dall'utilizzo di oppioidi. Questa condizione emotiva negativa viene definita *Hypercatifeia*. I meccanismi alla base dell'*Hypercatifeia* sono gli stessi dell'iperalgia. L'iperalgia è l'aumentata sensibilità al dolore che si osserva durante trattamento cronico con oppioidi, mentre l'*Hypercatifeia* è sostanzialmente un'aumentata sensibilità agli stress emotivi. Entrambi i fenomeni possono essere spiegati con l'incapacità dell'organismo di mantenere l'omeostasi in seguito all'eccessiva assunzione di farmaci oppioidi.

Dopamina effetto gratificante e addiction

I farmaci con potere gratificante e elevato potere d'abuso per l'uomo, mostrano lo stesso effetto anche negli animali. La somministrazione di sostanze d'abuso determina nell'animale un aumento dei livelli di dopamina nella shell del nucleo accumbens. Queste osservazioni indicano che il potere gratificante delle sostanze d'abuso è dovuto all'aumento della dopamina (Joseph et al. 2003)

L'aumento di dopamina indotto dagli oppioidi sembra essere dovuto all'attivazione di recettori per gli oppioidi situati su interneuroni GABAergici che esercitano un controllo tonico inibitorio sul sistema dopaminergico mesolimbico (Johnson et al. 1992). Gli oppioidi, inoltre, stimolano la plasticità a livello delle sinapsi dopaminergiche di tale sistema (Chen et al. 2010; Bryant et al. 2005).

Il sistema dopaminergico mesolimbico formato dall'area tegmentale ventrale (VTA) e dal nucleo accumbens, è parte integrante del circuito della gratificazione. Il nucleo accumbens rappresenta un'area di integrazione tra funzioni limbiche e motorie, è infatti a questo livello che gli stimoli rilevanti vengono processati e tradotti in azione. La dopamina del sistema limbico ha un ruolo fondamentale nelle proprietà di rinforzo di un dato stimolo e nell'apprendimento (Nestler 1996; Nestler 1997). L'addiction può essere considerata come un'alterazione dei normali meccanismi di apprendimento mediati dal sistema limbico attraverso il quale una sostanza d'abuso induce delle risposte aberranti prolungate a livello sinaptico (plasticità sinaptica) che sfociano nel "drug-seeking" ossia nella ricerca spasmodica della droga tipico dei soggetti "addicted" (Chen et al. 2010).

Sistema noradrenergico e crisi d'astinenza

Come descritto in precedenza l'uso prolungato di oppioidi determina l'insorgenza di dipendenza fisica che si traduce in una tipica crisi di astinenza quando la somministrazione del farmaco viene bruscamente interrotta. I meccanismi molecolari alla base della manifestazione della crisi d'astinenza sembrano ricondurre alla stimolazione dell'adenil ciclasi (di tipo I e VII) che determina una iperattivazione della via mediata dal cAMP e la fosforilazione e attivazione di CREB e di altri fattori di trascrizione. La iperattivazione della via del cAMP è una risposta omeostatica all'inibizione del sistema

noradrenergico nel locus coeruleus determinata dagli oppioidi. Il locus coeruleus regola le risposte allo stress, gli stati di attivazione (arousal) e diverse funzioni del sistema nervoso autonomo. L'azione inibitoria degli oppioidi sui neuroni del locus coeruleus va incontro a tolleranza, pertanto quando l'inibizione è meno efficace si osserva una iper attivazione del firing dei neuroni noradrenergici (Lane-Ladd et al.1997).

Un effetto simile sulla cascata del cAMP si osserva anche nel nucleo accumbens. L' attivazione di CREB determina, inoltre, un aumento dei livelli di dinorfina nella VTA che si traduce in una riduzione dei livelli di dopamina nel nucleus accumbens mediata dai recettori k. Questo effetto contribuisce all'insorgenza degli stati disforici e dell'anedonia presenti nelle prime fasi della crisi d'astinenza (Camì et al. 2003).

Obiettivi

La morfina è ancora il farmaco d'elezione nella terapia del dolore. Infatti nonostante i numerosi studi effettuati nel corso dei 200 anni trascorsi dal suo primo utilizzo non sono ancora state trovate alternative valide. Tuttavia la tolleranza all'effetto analgesico unitamente al potenziale d'abuso impongono la necessità di sviluppare nuove molecole dotate di analogo effetto analgesico ma ridotti effetti collaterali (Berger et. al . 2010)

In questo lavoro di tesi si è proceduto con la sintesi e con la valutazione del profilo farmacologico di derivati di nonani diazabicyclici aventi un anello principale omopiperazolico denominati 117OPa e 117OPb.

Lo studio è iniziato con la valutazione del profilo recettoriale e farmacologico del 117OPa a partire dall'analisi dell'affinità per i tre recettori per gli oppioidi. In seguito l'effetto di tre dosi crescenti del composto è stato paragonato a quello della morfina nell'hot-plate e nel tail flick (analgesia), nel test della formalina per valutare l'azione sul dolore di tipo infiammatorio, e nel "*spared nerve injury model*" per valutare l'azione sul dolore neuropatico. Per valutarne il potenziale d'abuso si è proceduto inizialmente con una valutazione più generica dell'effetto sui livelli di noradrenalina e dopamina nella shell del nucleus accumbens, con l'obiettivo di approfondire lo studio mediante test comportamentali più specifici (place preference, self-administration) in presenza di risultati positivi. Lo studio sul 117OPb è iniziato in una fase successiva. L'analisi del profilo farmacologico del 117OPb ci ha indotto a focalizzare l'attenzione soprattutto sulle proprietà di rinforzo e sulla gratificazione. Allo stato attuale, per limiti di tempo, lo studio del 117OPb si è concentrato soprattutto sulla valutazione dell'effetto analgesico sul test del tail flick e dell'hot-plate e sul test della formalina, e visti i dati preliminari sugli studi di microdialisi indicativi di un ridotto potenziale d'abuso si è proceduto direttamente con la valutazione dell'effetto del trattamento sub-cronico e con l'analisi di eventuali sintomi di astinenza in seguito alla somministrazione dell'antagonista naloxone.

Lo studio è in fase di prosecuzione per caratterizzare meglio il profilo farmacologico dei due composti, ma i risultati non sono presenti in questo lavoro di tesi.

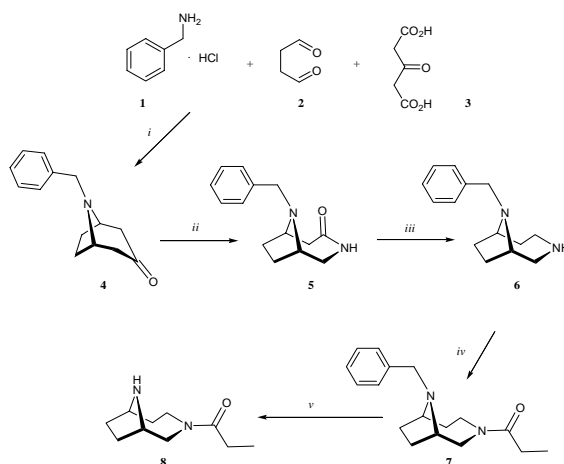
Sintesi

I composti progettati 117OPa e 117OPb sono stati sintetizzati secondo quanto descritto nei seguenti schemi.

Il benzil tropinone 4 è stato preparato mediante la classica reazione di Robinson-Schöpf che prevede la contemporanea condensazione tra la benzilammina cloridrata (1), l'aldeide succinnica (2) e l'acido 1,3-acetondicarbossilico (3).¹

Il chetone 4 nelle condizioni di reazione di Schmidt,² con acido solforico conc. e sodioazide, ha fornito l'amminolattame 5 che è stato di seguito ridotto a diammina 6 con litio alluminio idruro.² 6 è acilato con anidride propionica a corrispondente propionammide 7, che per idrogenolisi catalitica del gruppo protettivo benzilico ha consentito di isolare il 3-propionil-3,9-diazabicyclo[4.2.1]nonano (8).

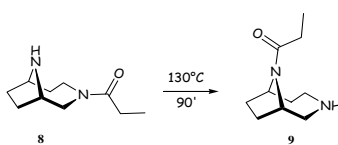
Schema 1



Reagenti e condizioni: (i) HCl 37%, AcONa 10%, H₂O, 50°C, 2h; (ii) H₂SO₄, NaN₃, 50°C, 2h (iii) LiAlH₄, THF, temperatura ambiente, 16h; (iv) (CH₃CH₂CO)₂O, CH₂Cl₂, 40°C, 1h; (v) H₂, Pd/C, EtOH, 3 atm., temperatura ambiente, 19h

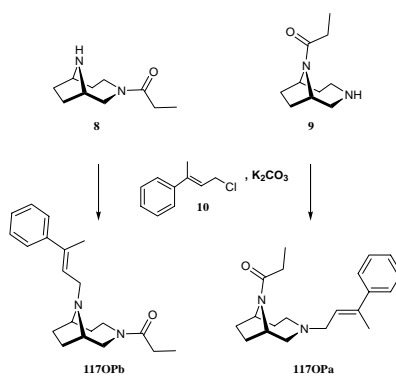
La trasposizione termica del gruppo acilico di 8 a 130°C per 90',³ ha fornito il 9-propionil-3,9-diazabicyclo[4.2.1]nonano 9 con resa del 69% recuperando in parte il prodotto non trasposto (~30%) (schema 2).

Schema 2



I precursori 8 e 9, separati per cromatografia flash dalla miscela di trasposizione, sono stati infine alchilati con il cloruro cinnamico 104,5 per dare i desiderati prodotti di alchilazione 117OPa e 117OPb (schema 3).

Schema 3



Affinità recettoriale

L'affinità delle molecole di nuova sintesi (117OPa e 117OPb) verso i recettori oppioidergici μ , δ e κ è stata valutata tramite radioreceptor binding assay (Binding recettoriale).

La sperimentazione è stata condotta secondo le linee guida della Comunità Europea per la sperimentazione animale (EEC n.86/609). Sono stati impiegati topi maschi CD1 (Charles River, Italia). Gli animali sono stati alloggiati 20 per gabbia in condizioni di stabulazione standard (temperatura $22\pm 2^\circ\text{C}$, umidità relativa 60%, illuminazione artificiale con ciclo luce buio di 12 ore). Il cibo e l'acqua sono state a disposizione *ad libitum*.

Il cervello in toto escluso il cervelletto è stato prelevato ed immediatamente utilizzato per lo studio dei recettori oppioidi. Il tessuto è stato omogeneizzato in 50 volumi di tampone Tris-HCl (50 mM pH 7.4 a 4°C) mediante un omogeneizzatore (Polytron) e centrifugato per 20 min a 48000 x g in una centrifuga refrigerata a 4°C . Il precipitato (pellet 1) è stato risospeso come sopra e incubato in un bagno termostato a 37°C per 45 min.

Successivamente l'omogenato è stato nuovamente centrifugato a 48000 x g per 20 min a 4°C ed il pellet finale è stato risospeso in 40 volumi di Tris HCl . Come ligandi radioattivi sono stati utilizzati: [3H]-DAMGO (D-Ala²,MePhe⁴,Glyol⁵) enkephalin per marcare i recettori μ ; [3H]-DPDPE (D-Pen²,Dpen⁵) enkephalin, per i recettori δ e [3H]-U69593 per i recettori κ . Aliquote di 200 μl di tessuto (0.2-0.5 mg di proteine) sono state incubate con il [3H]-DAMGO o con il [3H]-DPDPE o con il [3H]-U69593 in tampone Tris-HCl (50 mM, pH 7.4, a 25°C) per 45-60 min in un volume finale di 2 ml. L'incubazione è stata interrotta mediante l'aggiunta di tampone freddo e filtrazione sotto vuoto attraverso filtri Whatman GF/B. I filtri sono stati lavati 3 volte con 5 ml di tampone freddo e posti in contenitori di plastica contenenti liquido scintillante.

La radioattività presente nei filtri è stata misurata da uno spettrofotometro scintillatore. Il binding non specifico è stato misurato in presenza di naloxone 10 μM . I valori di K_i sono stati calcolati dalle curve di spiazzamento di ciascun composto valutati in un intervallo di concentrazioni comprese tra 10^{-11} e 10^{-5} M, utilizzando uno specifico programma per computer (GraphPad Prism 3.0, San Diego, CA, USA). La concentrazione finale delle proteine è stata determinata utilizzando il Kit Bio-Rad (Bio-Rad Laboratory GmbH, Monaco, Germania).

Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e i risultati confermati in cinque esperimenti indipendenti.

Risultati

	Ki nM	Ki nM	Ki nM
Farmaco	μ	δ	k
Morfina	1.0 ± 0.04	100.2 ± 5.14	280 ± 9.2
OP117a	$8,3 \pm 1,2$	933 ± 33	900 ± 100
OP117b	$5,7 \pm 1$	425 ± 25	55 ± 5

Tabella 1 I Valori di Ki sono stati ottenuti da 5 esperimenti indipendenti compiuti in triplicato e sono espressi come media \pm ESM.

Valutazione dell'attività sui recettori μ

Il recettore μ per gli oppioidi è un recettore di membrana accoppiato a proteine G (GPCRs) i quali controllano la trasduzione di numerosi segnali intracellulari.

Tra i processi intracellulari avviati dalla stimolazione delle proteine G, si ha l'attivazione della via delle protein-chinasi tramite fattori mitogeni (Mitogen-activated protein kinase – MAPK) (Coonse et al, 2007). Le chinasi sono attivate per fosforilazione sia di residui di tirosina che di treonina catalizzate da specifiche chinasi (MKK). Le MAPK attivate fosforilano i loro specifici substrati sui residui serinici o treoninici portando infine all'attivazione di diversi fattori di trascrizione. La loro attivazione è più frequentemente associata all' induzione dell' apoptosi (Martindale e Holbrook, 2002). Fra le MAPK, le Erk (Extracellular signal-regulated kinase) si distinguono in p44 e p42 MAPK (rispettivamente Erk1 e Erk2) esse agiscono in una cascata di fosforilazione proteica coinvolta nella regolazione della differenziazione e crescita della cellula (Marshall, 1995). Le MAPK sono attivate da un' ampia varietà di segnali extra cellulari. L'attivazione avviene attraverso la fosforilazione della treonina 202 e tirosina 204 negli umani o treonina 183 e tirosina 185 nei topi.

La capacità dei nuovi composti di modulare i recettori μ è stata valutata attraverso un modello in vitro basato sull'impiego della linea cellulare Human Neuroblastoma SH-SY5Y.

Le linee cellulari fornite dall'European Collection of Cell Cultures (ECACC) sono state acquistate dalla Sigma-Aldrich.

La linea cellulare SH-SY5Y è stata fatta crescere a 37°C, 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose integrato con 10% di siero fetale bovino (FBS), 1X Penicillina-Streptomicina, 2 mM L-Glutamina, 2,5 µg/mL Amfotericina B e 50 µg/mL Gentamicina.

Terreni di coltura, FBS, Penicillina-Streptomicina, L-Glutaminea, Amfotericina B e Gentamicina sono state acquistate dalla Sigma-Aldrich.

La linea cellulare SH-SY5Y è stata trattata con 117OPb e 117OPa ed i composti di riferimento DAMGO e CTAP in un volume finale di 10 µl/mL di sospensione cellulare per analisi dose/risposta e competizione. Prima di procedere con lo studio dose risposta dei nuovi composti, è stata effettuata un'analisi dose risposta con il composto di riferimento DAMGO, per individuare il tempo di esposizione.

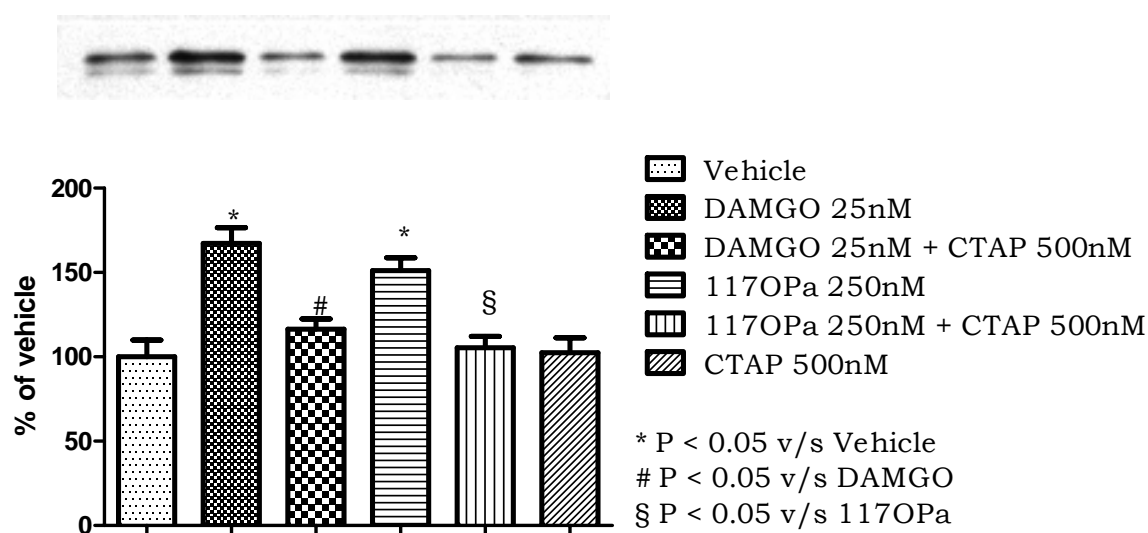
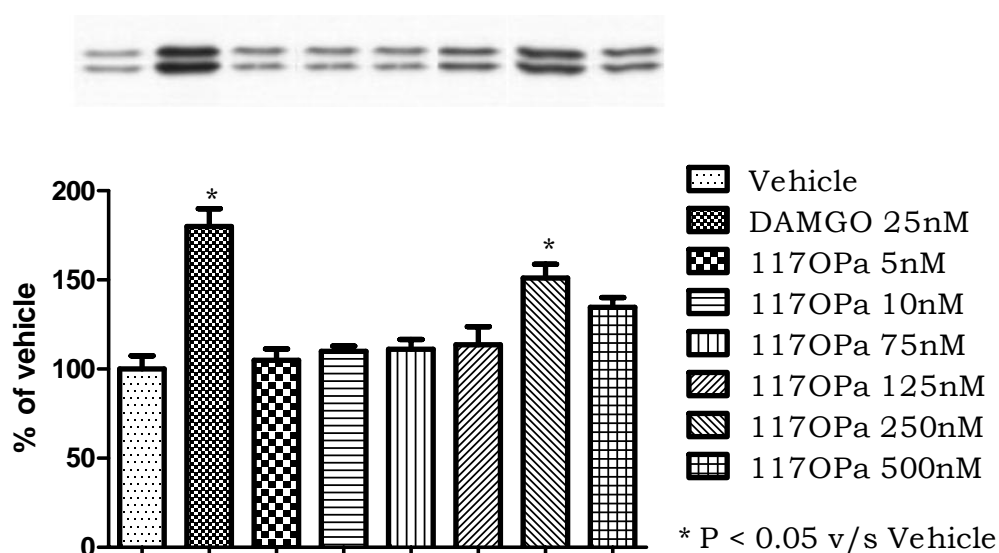
Lo studio dose/risposta dell'espressione di P-ERK 1/2 nelle linea cellulare SH-SY5Y avviene a seguito di un'esposizione di 5 minuti sul recettore µ dell'agonista DAMGO 25 nM e differenti concentrazioni di 117OPb e 117OPa. L'esposizione di questi recettori induce una rapida fosforilazione e attivazione di ERK. L'effetto di 5 minuti di pretrattamento con l'antagonista CTAP 500 nM abolisce l'azione dell'agonista, indicando che l'attivazione di P-ERK 1/2 è µ specifica.

Western Blotting

Per l'analisi Western Blotting, la concentrazione proteica degli estratti proteici è stata determinate usando Quant-iT™ Protein Assay Kit (Invitrogen™) ed il sistema Qubit® Quantitation Platform (Invitrogen™). 40 µg di proteine per pozzetto sono state separate su Bis-Tris Gel (NuPAGE® Novex® Invitrogen™) al 10% e trasferite su membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad). La membrana è stata incubata over night con l'anticorpo primario Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody (diluizione 1:1000) e successivamente, per due ore con l'anticorpo secondario Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (diluizione 1:3000). Il segnale di chemiluminescenza è stato visualizzato con l'uso di Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). Le bande immunoreattive sono state visualizzate da Fujifilm Las-1000 analyzer (Raytest Isotopenmessgeräte) e la densità ottica è stata misurata usando il software AIDA 2.11 software (Raytest Isotopenmessgeräte). I differenti livelli di P-ERK sono espressi come percentuale di controllo ± SEM. L'analisi statistica è stata effettuata tramite il test one-way Anova seguito dal post test di Dunnet utilizzando il programma GraphPad Prism 5.

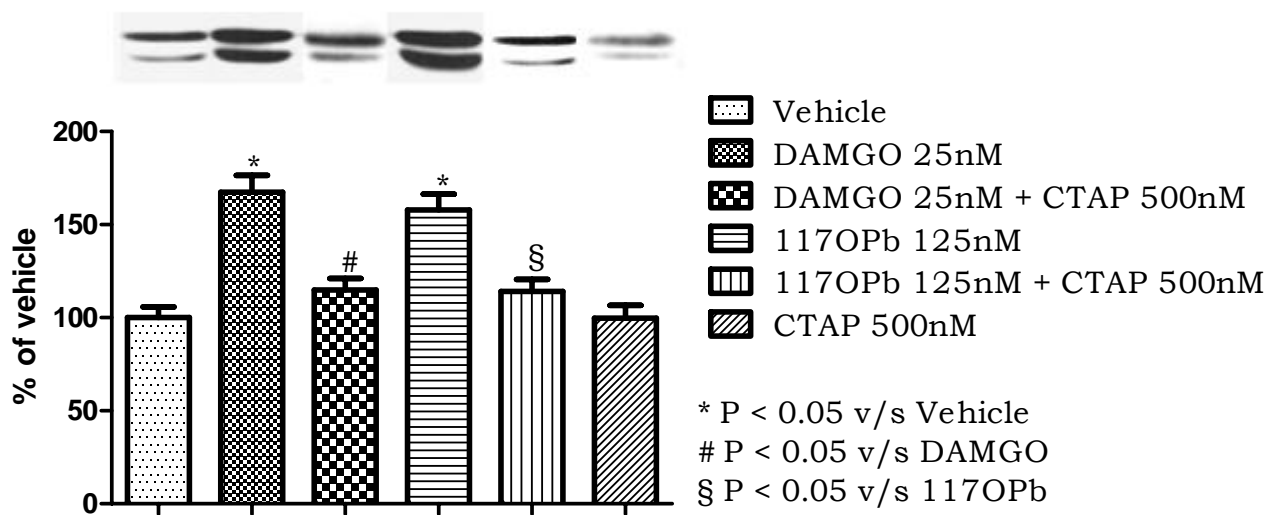
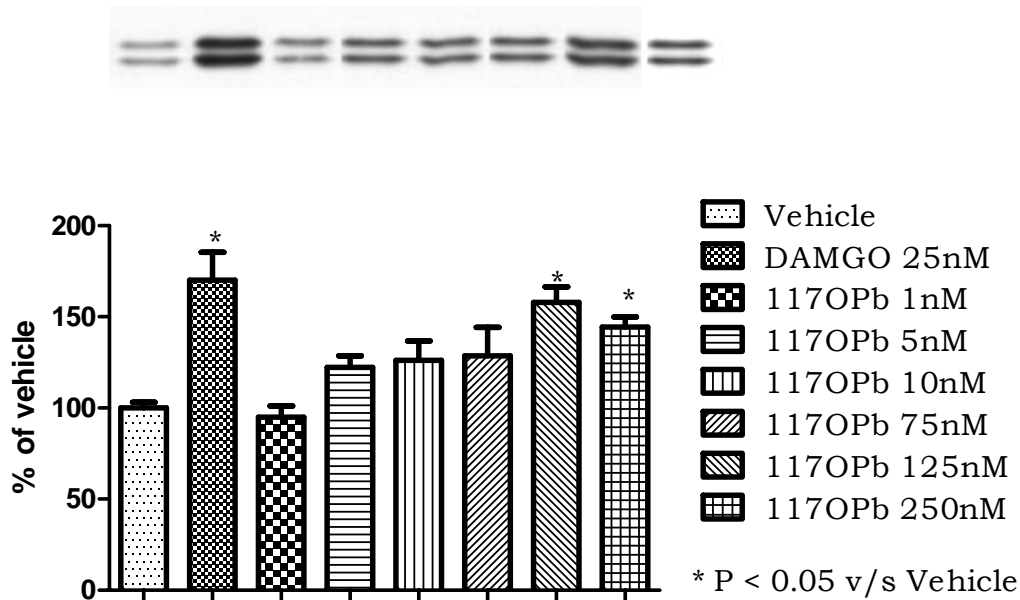
Risultati

Analisi 117OPa su recettori μ : Nella figura 1 è mostrato lo studio dose/risposta dell'espressione di P-ERK 1/2 a seguito di un'esposizione di 5 minuti sul recettore μ dell'agonista DAMGO 25nM e differenti concentrazioni di 117OPa, espresse in nM. L'effetto di 5 minuti di pretrattamento con l'antagonista CTAP 500nM è mostrato in figura 2. I dati sono presentati come media della percentuale del veicolo.



Analisi 117OPb su recettori μ : Nella figura 3 è mostrato lo studio dose/risposta dell'espressione di P-ERK 1/2 a seguito di un'esposizione di 5 minuti sul recettore μ dell'agonista DAMGO 25nM e

differenti concentrazioni di 117OPb, espresse in nM. L'effetto di 5 minuti di pre-trattamento con l'antagonista CTAP 500nM è mostrato in figura 4. I dati sono presentati come media della percentuale del veicolo.



La valutazione dell'attività intrinseca del 117OPb per i recettori k è in fase di svolgimento.

Drug Delivery

Il 117OPa e il 117OPb sono stati somministrati sottoforma di microemulsione.

Le microemulsioni sono considerate dei potenziali ottimi sistemi di drug delivery. Esse sono costituite da olio, acqua, tensioattivo e in alcuni casi da un cotensioattivo. Le droplets (goccioline di olio in acqua o acqua in olio) presentano un diametro medio inferiore a 150nm. In campo farmaceutico possono essere utilizzate come riserve di farmaci sia per rilasci prolungati che per rilasci per via sottocutanea e transdermale. La dispersione del principio attivo all'interno di droplets dell'ordine dei nanometri può aumentare infatti la velocità di dissoluzione nel mezzo acquoso e in generale la biodisponibilità *in vivo* (Lawrence e Rees 2000).

Al fine di ottenere sistemi liquidi biocompatibili da utilizzare tal quali per la somministrazione parenterale di principi attivi con differenti caratteristiche chimico-fisiche, sono stati individuati e caratterizzati sistemi costituiti da acqua, Solutol[®]HS15 (tensioattivo non ionico) e mono-trigliceridi a media catena. La peculiarità di tali materiali, oltre al fatto non trascurabile di esser approvati dall'FDA per utilizzo sull'uomo, è che, se miscelati in opportune proporzioni e con alcuni accorgimenti operativi (i.e. temperatura), danno origine a microemulsioni liquide e stabili: la caratterizzazione tramite spettroscopia NMR, SAXS e microscopia ottica, ha confermato inoltre la loro ampia modulabilità e versatilità. Le variazioni microstrutturali che si riscontrano all'interno di uno stesso diagramma di fase consentono, per esempio, di solubilizzare composti farmacologicamente attivi sia idrofili che lipofili, senza l'esigenza di cambiare tipo di sistema.

Materiali

Il trigliceride di origine naturale (Miglyol[®]812 Spezialoel) è stato fornito da Sasol Germany GmbH (Witten, Germany). Il tensioattivo commerciale biocompatibile e validato per somministrazione parenterale Solutol[®]HS15 (Polyethylene glycol 660 hydroxystearate) è stato fornito dalla BASF GmbH (Germania): esso è costituito approssimativamente da uguali quantità in peso di polietilenglicole-15-idrossistereato (PEO-HS) e polietilenglicole libero (PEO). La soluzione salina 0.9% NaCl sterile è stata fornita dalla Eurospital.

Metodo di preparazione

I campioni sono stati preparati pesando direttamente la corretta quantità dei componenti (principio attivo, olio, tensioattivo e soluzione salina) in provette di vetro, mantenendo costante il rapporto olio tensioattivo e variando il contenuto del principio attivo e della fase acquosa.

Composizione percentuale in peso delle microemulsioni				
<i>DOSE</i>	117OPa o 117OPb	M812S	HS15	Soluzione Salina
<i>10 mg/Kg/5mL</i>	0,2	2,0	9,3	88,5
<i>20 mg/Kg/5mL</i>	0,4	2,0	9,3	88,3
<i>40 mg/Kg/5mL</i>	0,8	2,0	9,3	87,9
<i>60 mg/Kg/5mL</i>	1,2	2,0	9,3	87,5
<i>80 mg/Kg/5mL</i>	1,6	2,0	9,3	87,1
<i>100 mg/Kg/5mL</i>	2,0	2,0	9,3	86,7

Analgesia

I modelli sperimentali che consentono di studiare la sensibilità al dolore (nocicezione) possono essere distinti in tre categorie principali: test che valutano la risposta a stimoli nocicettivi di elevata intensità (modelli di dolore acuto), test che valutano la risposta comportamentale spontanea o indotta in animali con un danno tissutale periferico o con infiammazione in corso, e test che valutano la risposta a stimoli termici e meccanici in seguito a un danno provocato a livello dei nervi periferici (dolore neuropatico) (Bannon e Malmberg 2007).

I modelli di dolore acuto indotto da stimoli termici di forte intensità sono l'hot-plate e il tail-flick.

Il dolore persistente indotto da danno tissutale periferico o da infiammazione viene studiato con il test della formalina.

Diverse evidenze sperimentali indicano che i neuromodulatori coinvolti nelle risposte al dolore sono diversi per i diversi modelli sperimentali, quindi per ottenere un quadro completo circa gli effetti analgesici di una data sostanza è necessario utilizzare modelli animali che differiscono tra loro per qualità, intensità e durata dello stimolo nocicettivo applicato.

Tail-Flick e Hot-Plate

In entrambi i test la stimolazione dolorifica è prodotta da una fonte di calore, ma il significato funzionale dei due test non sembra essere lo stesso. Il Tail-flick rappresenta soprattutto un riflesso spinale di risposta al dolore mentre l'Hot-plate misura una risposta comportamentale che coinvolge i centri cerebrali superiori (Couto et al. 2010).

Tail-flick

Sono stati utilizzati topi maschi CD1 (20-25 g). Il test consiste nel valutare il tempo intercorso tra l'esposizione di una parte della coda del topo (a 2 cm dalla punta della coda) ad una piccola fonte di calore e l'allontanamento della coda dalla fonte stessa (Bannon et al., 2007). L'intervallo di tempo è

stato valutato tramite un' apparecchiatura specifica per il test del Tail-flick (Apparato per il Tail-flick, Ugo Basile, Italia), dotata di una lampada ad infrarossi come fonte regolabile di calore, e in grado di calcolare automaticamente il tempo durante il quale la coda del topo è rimasta a contatto con la fonte di calore (tempo di latenza).

L'intensità del calore emesso dalla lampada è stata regolata in modo tale che nei topi non trattati il tempo di latenza fosse di 2-4 secondi.

Per evitare lesioni ai tessuti il tempo massimo di latenza è stato fissato in 12 sec. (cut-off). Dopo tale intervallo di tempo la coda del topo è stata comunque allontanata dalla fonte di calore.

I dati ottenuti sono stati espressi in MPE% ossia analgesia percentuale massima che è stata calcolata secondo la formula:

$$\% \text{ MPE} = \left[\frac{\text{Latenza Test (sec.)} - \text{Latenza di base (sec.)}}{\text{Cut off (sec.)} - \text{Latenza di base (sec.)}} \right] \times 100$$

in cui per latenza test si intende il tempo in sec. che l'animale impiega per allontanare la coda dalla fonte di calore in seguito a trattamento farmacologico, e per latenza di base lo stesso tempo in assenza del trattamento. Si è proceduto inizialmente con la valutazione del tempo di latenza basale, ossia in assenza di trattamento farmacologico, in seguito gli animali sono stati assegnati in maniera casuale a gruppi sperimentali diversi per trattamento: veicolo (soluzione fisiologica), veicolo formulazione, morfina (10mg/kg ip), 117OPa (5, 10 e 20 mg/kg ip), e 117OPb (5, 10 e 20 mg/kg ip).

Risultati

Il trattamento con morfina e con 117OPa alla dose di 10 e 20 mg/kg produce un effetto analgesico dopo mezz'ora dalla somministrazione di ciascun farmaco. Tale effetto persiste anche dopo un'ora. A distanza di due ore dal trattamento solo la morfina e il 117OPa a 20mg/kg presentano un effetto analgesico statisticamente significativo. Quando somministrato alla dose di 5mg/kg il 117OPa non mostra alcun effetto analgesico. L'effetto analgesico di tutti i farmaci testati non è più presente a distanza di 4 ore dal trattamento. (Fig.6)

La somministrazione di 117OPb non produce effetto analgesico dopo 30 min. dal trattamento. L'effetto analgesico compare dopo un'ora ed è statisticamente significativo per tutte e tre le dosi somministrate. Tale effetto non è più rilevabile dopo 2h.

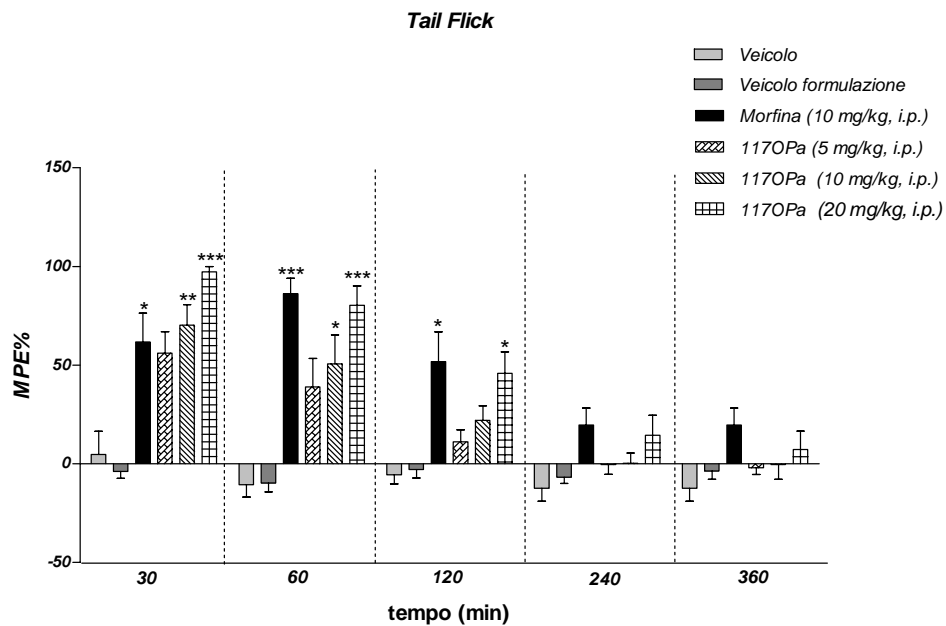


Fig.6 Effetto del veicolo, del veicolo formulato, della morfina (10 mg/kg i.p.) e dell' 117OPa (5, 10, 20 mg/kg i.p.) sul tail-flick. Le colonne rappresentano la media \pm ESM (errore standard medio) dell'effetto massimo possibile (MPE%). La significatività statistica è stata calcolata con l'analisi one-way Anova seguita dal test di Tukey (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

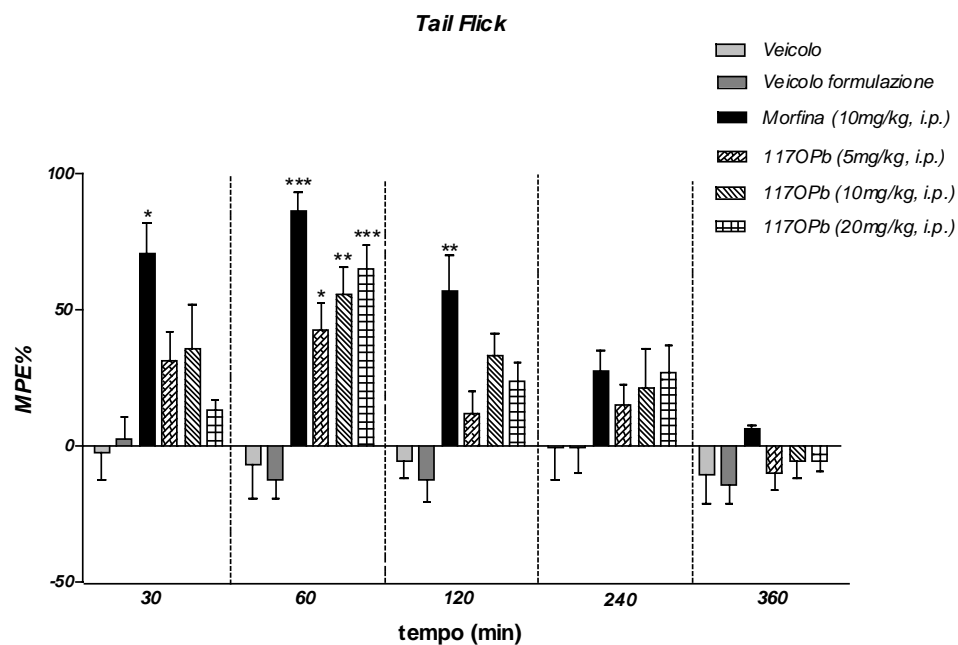


Fig.7 Effetto del veicolo, del veicolo formulato, della morfina (10 mg/kg i.p.) e dell' 117OPb (5, 10, 20 mg/kg i.p.) sul tail-flick. Le colonne rappresentano la media \pm ESM (errore standard medio) dell'effetto massimo possibile (MPE%). La significatività statistica è stata calcolata con l'analisi one-way Anova seguita dal test di Tukey (*P \leq 0.05, ** P \leq 0.01,***P \leq 0.001).

Hot-plate

Sono stati utilizzati topi maschi CD1 (20-25 g).

L'animale è stato adagiato su una piastra calda ed è stato misurato il tempo dopo il quale è comparsa la risposta nocicettiva. Sono stati considerati come segni di sofferenza mostrati dall'animale i seguenti comportamenti: sollevamento delle zampe (anteriori o posteriori), leccamento delle stesse e salti. Alla comparsa di questi segni, l'animale è stato immediatamente rimosso dalla piastra. Per evitare lesioni ai tessuti delle zampe è stato assegnato un valore tempo massimo di latenza (cut-off) di 14 secondi, dopo il quale l'animale è stato rimosso comunque dall'apparecchio. I valori ottenuti dalla sperimentazione anche in questo caso sono stati espressi in MPE % .

Risultati

La somministrazione di morfina e di 117OPa a 20mg/kg determina un effetto analgesico nel test dell'hot-plate dopo 30min. A distanza di un'ora dal trattamento l'effetto analgesico diventa significativo anche dopo la somministrazione del 117OPa alla dose di 5 e 10mg/kg. Tale effetto perdura dopo 2h ma non è statisticamente rilevante. (Fig.8)

La somministrazione di 117OPb determina un effetto analgesico paragonabile a quello della morfina dopo 30min quando somministrato alla dose di 10 e 20mg/kg. Tale effetto perdura nel tempo ed è statisticamente rilevante anche dopo 2h. Il 117OPb mostra un effetto analgesico dopo 1h anche alla dose di 5mg/kg. L'effetto analgesico del 117OPb alla dose di 10 e 20mg/kg è ancora presente dopo 3 h ma non risulta significativo da un punto di vista statistico. (Fig.9)

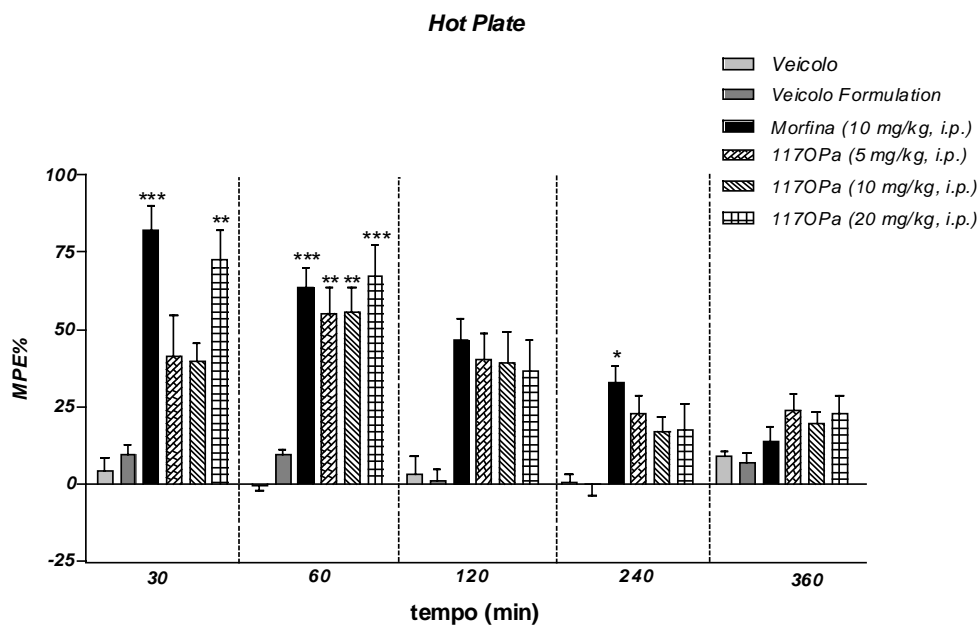


Fig.8 Effetto del veicolo, del veicolo formulato, della morfina (10 mg/kg i.p.) e dell' 117OPa (5, 10, 20 mg/kg i.p.) sul test del hot-plate. Le colonne rappresentano la media \pm ESM (errore standard medio) dell'effetto massimo possibile (MPE%). La significatività statistica è stata calcolata con l'analisi one-way Anova seguita dal test di Tukey (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$,*** $P \leq 0.001$).

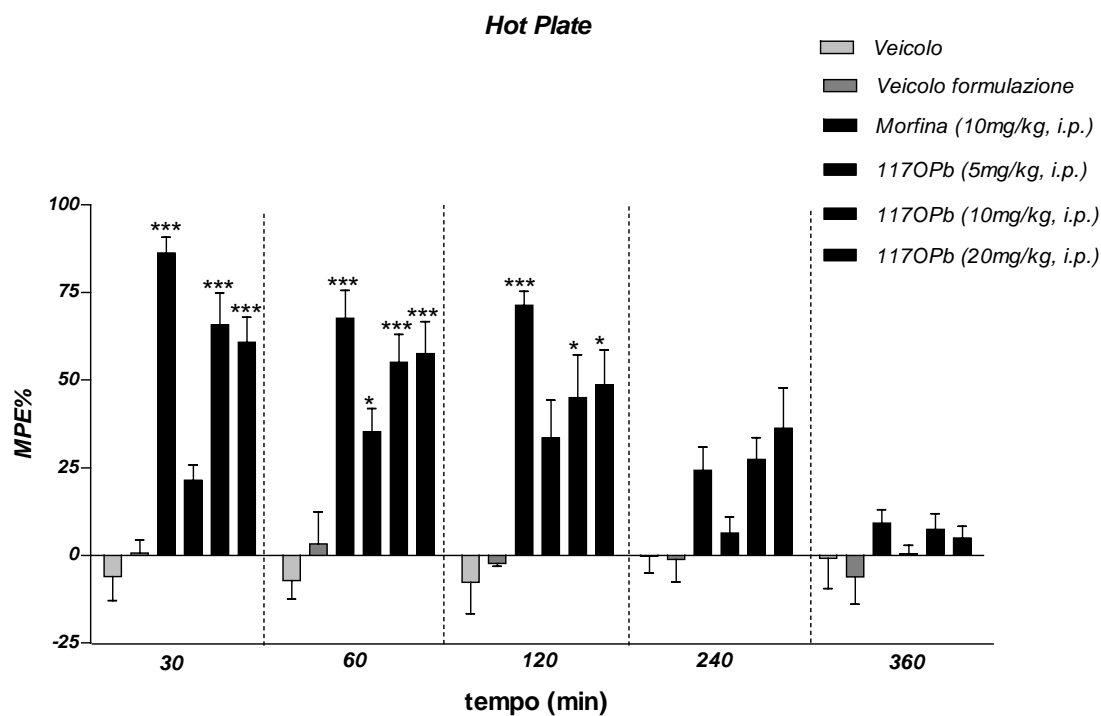


Fig.9

Fig. 9 Effetto del veicolo, del veicolo formulato, della morfina (10 mg/kg i.p.) e dell' 117OPb (5, 10, 20 mg/kg i.p.) sul test del hot-plate. Le colonne rappresentano la media \pm ESM (errore standard medio) dell'effetto massimo possibile (MPE%). La significatività statistica è stata calcolata con l'analisi one-way Anova seguita dal test di Tukey (*P \leq 0.05, ** P \leq 0.01,***P \leq 0.001).

Per valutare il coinvolgimento dei recettori per gli oppioidi si è proceduto con la somministrazione dell' antagonista selettivo, naloxone (5mg/kg i.p.) 20 min prima della somministrazione di morfina e di 117OPa. Il tail-flick e l'hot-plate sono stati eseguiti dopo 60 minuti dal trattamento.

Come descritto nell'introduzione gli esperimenti relativi al 117OPb sono in fase di completamento, pertanto i risultati ottenuti non sono stati inseriti.

Come si può osservare dalle figg. 10 e 11 rispettivamente, sia nel tail-flick che nell'hot-plate l'effetto analgesico della morfina e del 117OPa viene inibito dal naloxone indicando che l'effetto è mediato dai recettori per gli oppioidi.

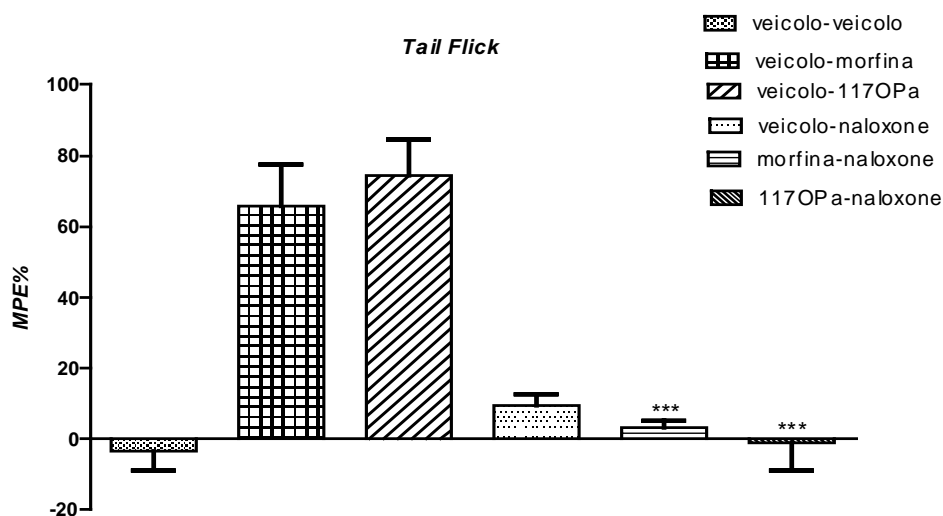


Fig. 10 Effetto del veicolo, della morfina e del 117OPa in seguito a somministrazione di veicolo o di naloxone (5mg/kg i.p.). Le colonne rappresentano la media \pm ESM (errore standard medio) dell'effetto massimo possibile (MPE%). La significatività statistica è stata calcolata con l'analisi one-way Anova seguita dal test di Tukey. (***P \leq 0.001).

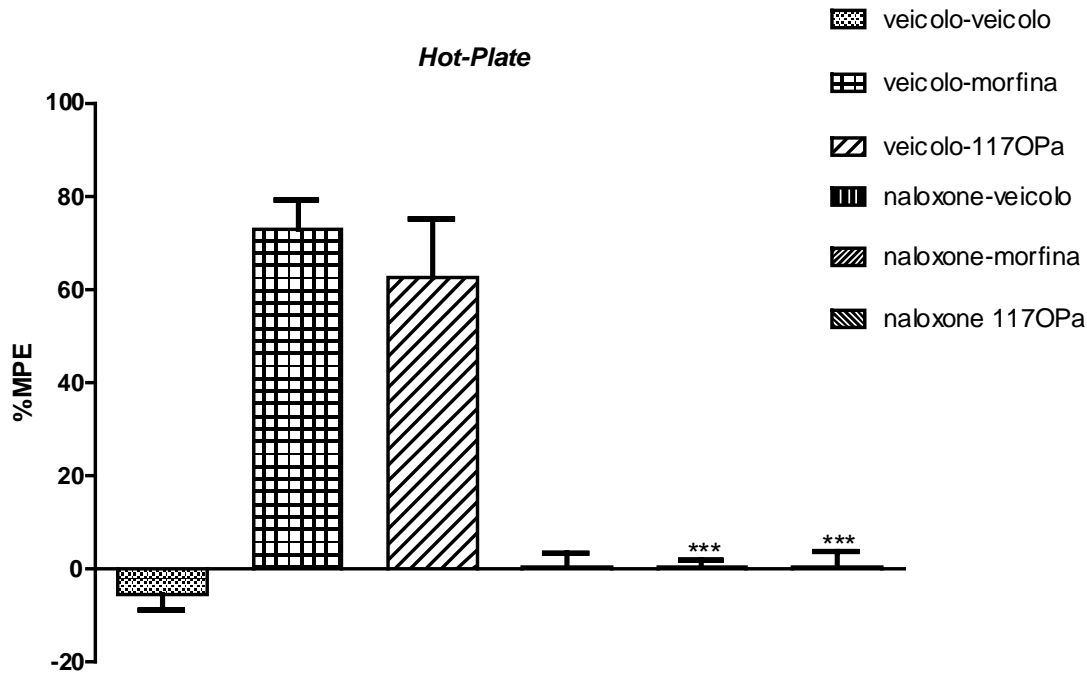


Fig.11 Effetto del veicolo, della morfina e del 117OPa in seguito a somministrazione di veicolo o di naloxone (5mg/kg i.p.). Le colonne rappresentano la media \pm ESM (errore standard medio) dell'effetto massimo possibile (MPE%). La significatività statistica è stata calcolata con l'analisi one-way Anova seguita dal test di Tukey. (***) $P \leq 0.001$.

Come sottolineato in precedenza uno dei problemi clinici più rilevanti nell'uso della morfina e degli analgesici oppioidi in generale, è la comparsa di tolleranza all'effetto analgesico. Per valutare la comparsa di tolleranza, l'effetto del trattamento ripetuto con 117OPa è stato paragonato a quello della morfina. L'effetto analgesico è stato valutato con il test del tail-flick e dell' hot-plate in giorni consecutivi fino a che tale effetto è risultato statisticamente significativo.

Risultati

I dati sono stati analizzati con il test one-way Anova seguito dal post test di Tukey.

L'effetto analgesico della morfina e del 117OPa presenta un andamento sovrapponibile nel test del tail-flick, infatti per entrambi l'effetto analgesico va in tolleranza dopo 3 giorni consecutivi di somministrazione (Fig.12).

Nel test dell'hot-plate l'andamento è leggermente diverso. L'effetto della morfina come nel tail-flick è statisticamente significativo fino al terzo giorno di trattamento, mentre l'effetto del 117OPa permane anche al quarto giorno (Fig.13).

In generale l'effetto analgesico dei due farmaci è comparabile sia dal punto di vista dell'entità che per quanto riguarda la tolleranza.

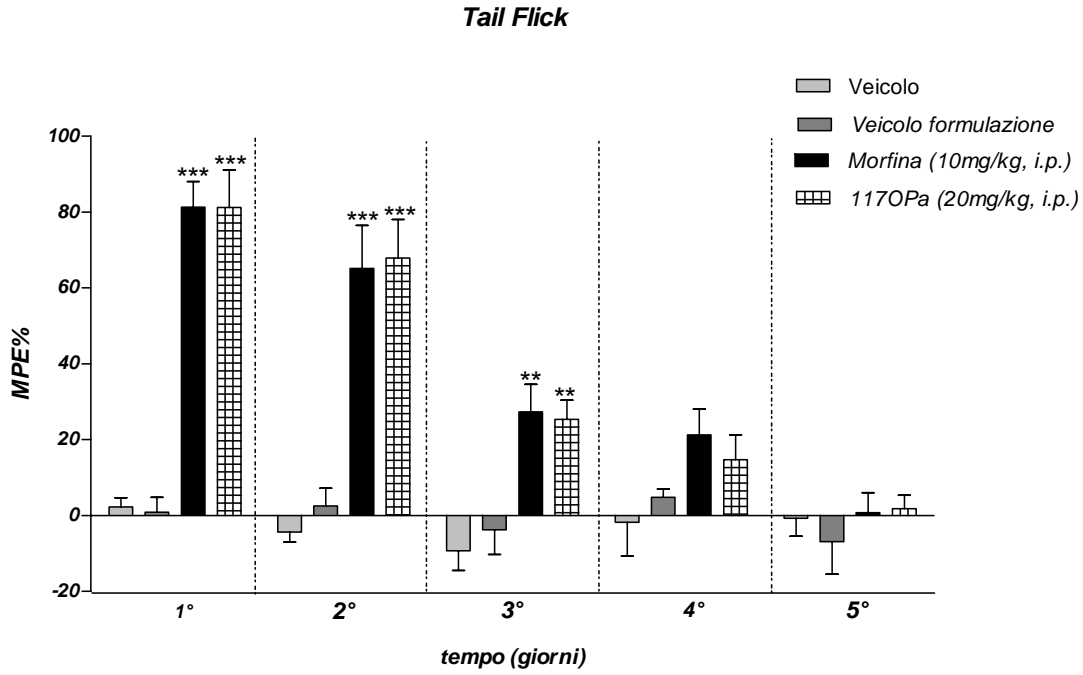


Fig.12 Effetto della somministrazione ripetuta (5 giorni) del veicolo, del veicolo formulato, della morfina (10mg/kg i.p.) e del 117OPa (20mg/kg) sul test del tail-flick. Le colonne rappresentano la media \pm ESM (errore standard medio) dell'effetto massimo possibile (MPE%). La significatività statistica è stata calcolata con l'analisi one-way Anova seguita dal test di Tukey. (** $P \leq 0.01$ e *** $P \leq 0.001$ rispetto al veicolo).

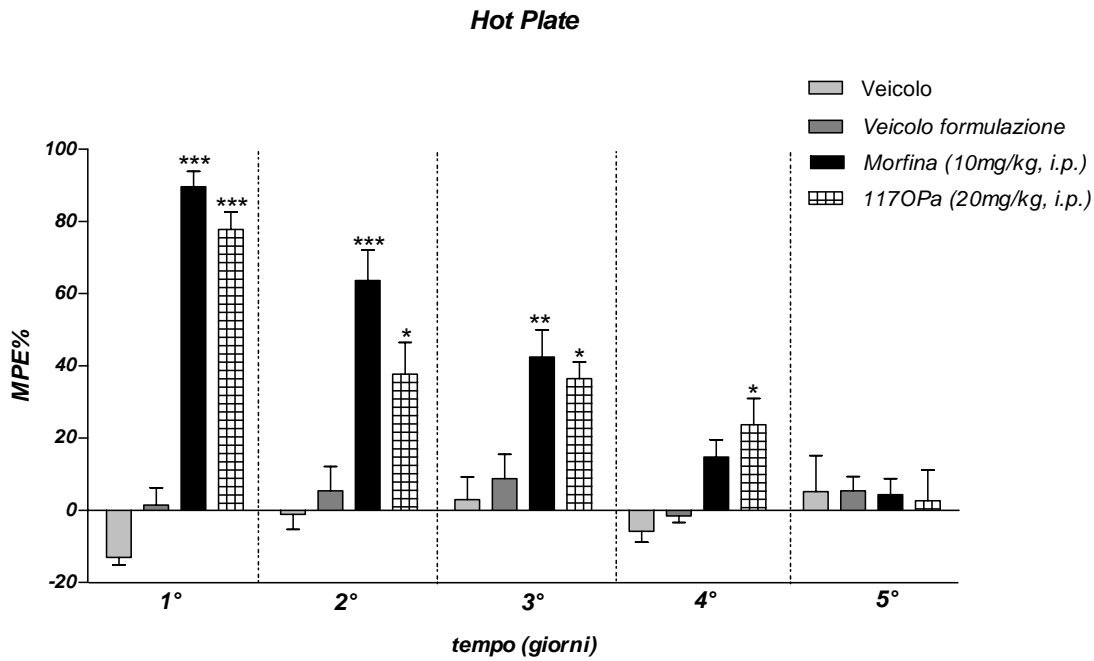


Fig.13 Effetto della somministrazione ripetuta (5 giorni) del veicolo, del veicolo formulato, della morfina (10mg/kg i.p.) e del 117OPa (20mg/kg) sul test del hot-plate. Le colonne rappresentano la media \pm ESM (errore standard medio) dell'effetto massimo possibile (MPE%). La significatività statistica è stata calcolata con l'analisi one-way Anova seguita dal test di Tukey. (* P \leq 0.05; **P \leq 0.01 e ***P \leq 0.001 rispetto al veicolo).

Test della formalina

Questo test viene utilizzato per valutare l'effetto analgesico delle sostanze sugli stati di dolore persistente causati da un danno tissutale (Coderre e Melzack , 1992; Sheu 2002;. Bannon et al., 2007).

La formalina, dopo la somministrazione, genera un danno a livello tissutale che altera lo stato funzionale del sistema nervoso sensoriale. L'iniezione della formalina produce una risposta nocicettiva bifasica. La prima fase di tipo sensoriale, ha inizio immediatamente dopo l'iniezione di formalina ed è caratterizzata dall'attivazione delle fibre sensoriali C ed A δ ; la seconda fase del test viene definita di tipo infiammatorio in quanto associata alla liberazione dei mediatori dell'infiammazione e ad una sensibilizzazione centrale. Tuttavia cambiamenti indotti durante la prima fase a livello del midollo spinale sembrano contribuire allo sviluppo della seconda fase. Il test della formalina è caratterizzato da una risposta comportamentale nocicettiva bifasica. (Rosland et al. 1990; Coderre e Melzack , 1992; Sheu, 2002).

La prima fase è di breve durata, circa 7-10 minuti, e rappresenta la risposta acuta all'agente dannoso. Segue un periodo di quiescenza dopo il quale insorge una seconda fase più duratura (15-60 minuti) dovuta alla sensitizzazione sia delle fibre primarie afferenti che delle componenti spinali del sistema nocicettivo, viene indicato come dolore tonico.

Sono stati impiegati topi maschi CD1 (Charles River, Italia), gli animali sono stati alloggiati 20 per gabbia in condizioni di stabulazione standard (temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidità relativa 60%, illuminazione artificiale con ciclo luce buio di 12 ore).

Si è proceduto inizialmente con la messa a punto del modello sperimentale per l'individuazione delle condizioni sperimentali adeguate. Una volta implementato il modello sono state individuate le due fasi sperimentali : da 0-5 min per la risposta analgesica e da 30-40 min per la risposta antinfiammatoria.

Il giorno della sperimentazione ogni topo è stato assegnato in modo casuale a uno dei gruppi sperimentali e collocato in una gabbia di plexiglas per un periodo di familiarizzazione di 60 min prima della somministrazione di formalina. Per consentire la completa visualizzazione delle zampe posteriori sotto la gabbia è stato sistemato uno specchio. La formalina (20 μl di una soluzione acquosa al 5%) è stata somministrata nella superficie dorsale della zampa posteriore destra (Rosland et al. 1990)

Sono stati quindi osservati due parametri rappresentativi della risposta nocicettiva: il numero di volte che l'animale ha sollevato e leccato la zampa.

Il veicolo, la morfina, e tre dosi crescenti (5, 10 e 20 mg/kg) di 117OPa o di 117OPb sono stati somministrati 30 min prima del test.

La risposta nocicettiva è stata monitorata per 60 min dalla somministrazione di formalina a intervalli consecutivi di 5 min.

Risultati

La morfina, il 117OPa e il 117OPb a tutte le dosi somministrate mostrano un effetto significativo nel test della formalina. Entrambi i farmaci sono efficaci nel ridurre sia la risposta precoce, rappresentativa del dolore acuto, che la risposta tardiva più rappresentativa di un dolore di tipo tonico.

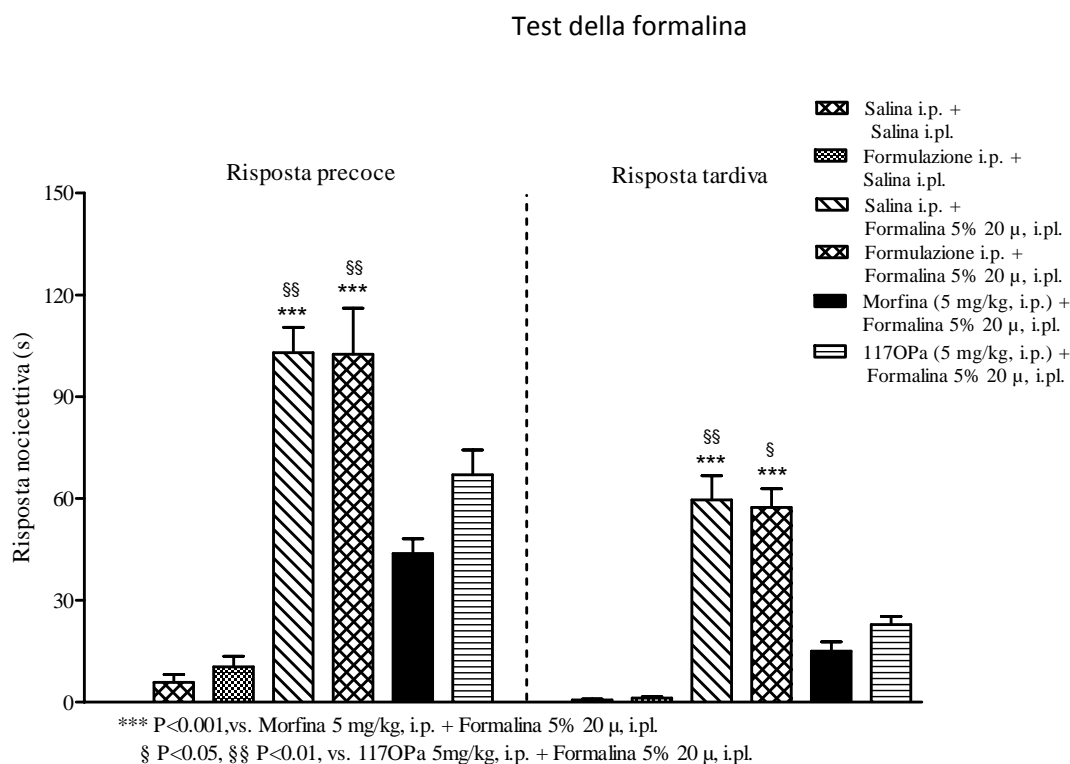


Fig.14 Effetto del veicolo, del veicolo formulato, della morfina (5 mg/kg i.p.) e dell' 117OPa (5 mg/kg i.p.) sul test della formalina. Le colonne rappresentano la media \pm ESM (errore standard medio) della durata in sec della risposta nocicettiva. La significatività statistica è stata calcolata con l'analisi one-way Anova seguita dal test di Tukey (**P \leq 0.001 rispetto alla Morfina 5 mg/kg, i.p. + Formalina 5% 20 µ, i.pl, § P<0.05, §§ P<0.01 117OPa 5mg/kg, i.p. + Formalina 5% 20 µ, i.pl.)

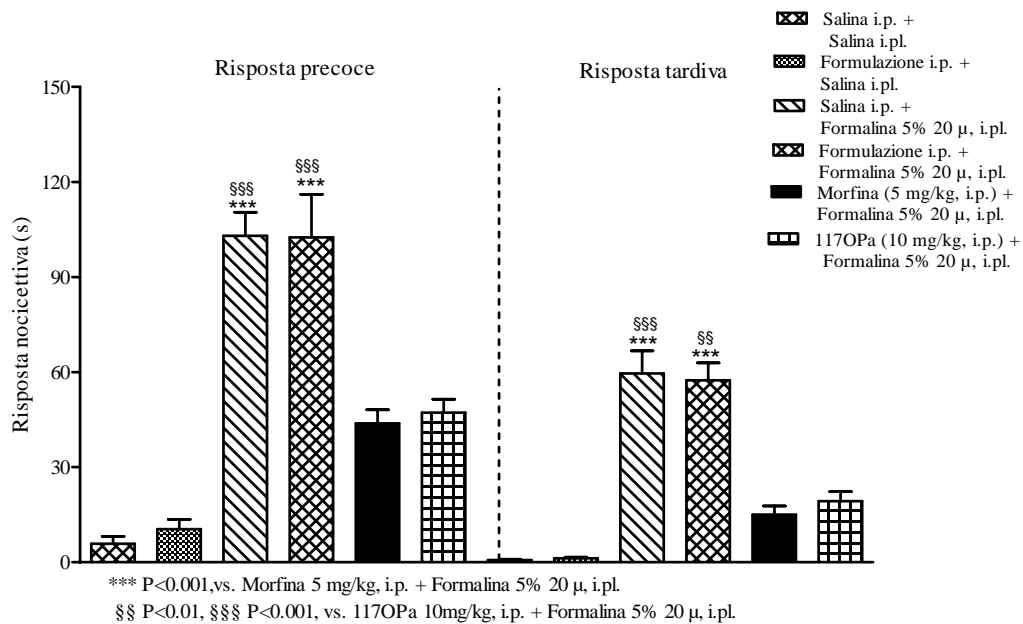


Fig.15 Effetto del veicolo, del veicolo formulato, della morfina (5 mg/kg i.p.) e dell' 117OPa (10 mg/kg i.p.) sul test della formalina. Le colonne rappresentano la media \pm ESM (errore standard medio) della durata in sec della risposta nocicettiva. La significatività statistica è stata calcolata con l'analisi one-way Anova seguita dal test di Tukey (*** P<0.001, vs. Morfina 5 mg/kg, i.p. + Formalina 5% 20 µ, i.pl.; §§ P<0.01, §§§ P<0.001, vs. 117OPa 10mg/kg, i.p. + Formalina 5% 20 µ, i.pl.)

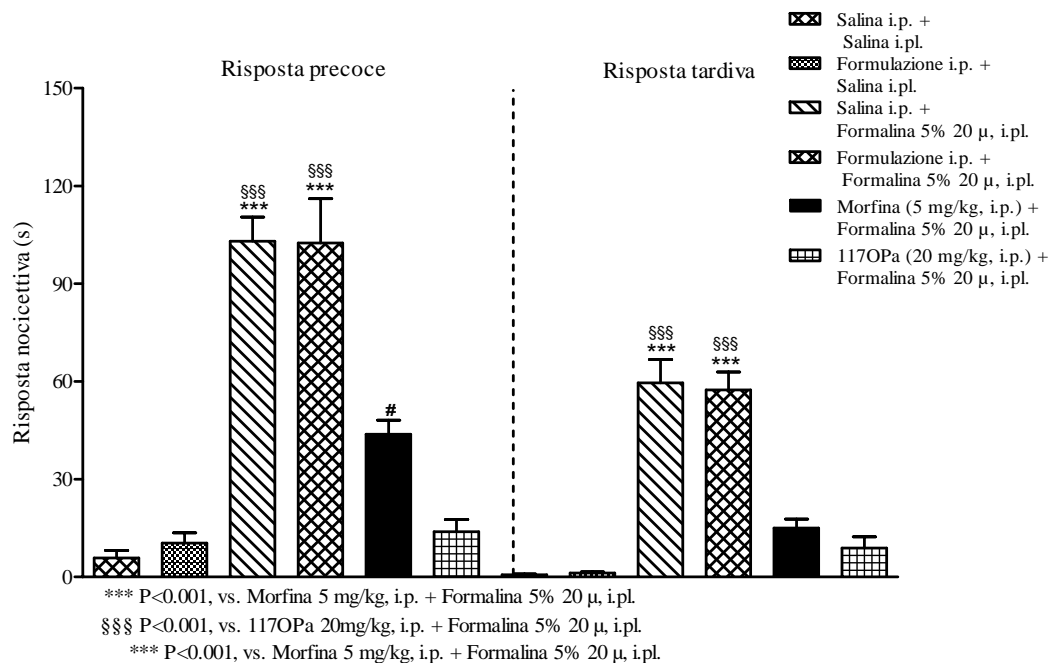


Fig.16 Effetto del veicolo, del veicolo formulato, della morfina (5 mg/kg i.p.) e dell' 117OPa (20 mg/kg i.p.) sul test della formalina. Le colonne rappresentano la media \pm ESM (errore standard medio) della durata in sec della risposta nocicettiva. La significatività statistica è stata calcolata con l'analisi one-way Anova seguita dal test di Tukey (§§§ P<0.001, vs. 117OPa 20mg/kg, i.p. + Formalina 5% 20 µ, i.pl.; *** P<0.001, vs. Morfina 5 mg/kg, i.p. + Formalina 5% 20 µ, i.pl.)

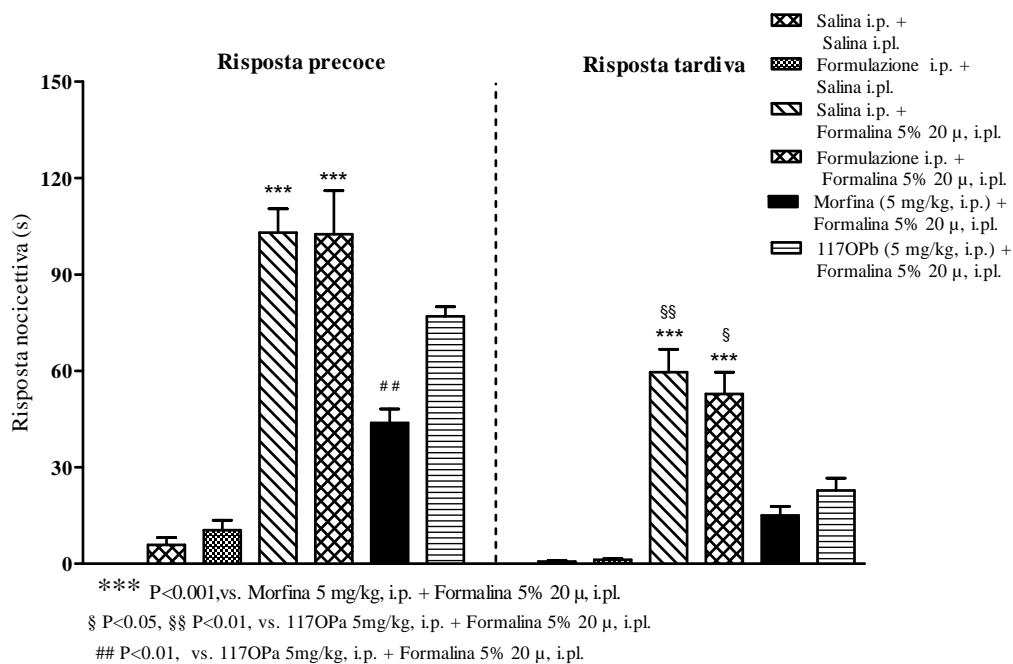


Fig.17 Effetto del veicolo, del veicolo formulato, della morfina (5 mg/kg i.p.) e dell' 117OPb (5 mg/kg i.p.) sul test della formalina. Le colonne rappresentano la media \pm ESM (errore standard medio) della durata in sec della risposta nocicettiva. La significatività statistica è stata calcolata con l'analisi one-way Anova seguita dal test di Tukey (*** P<0.001, vs. Morfina 5 mg/kg, i.p. + Formalina 5% 20 µ, i.pl.; § P<0.05, §§ P<0.01, vs. 117OPa 5mg/kg, i.p. + Formalina 5% 20 µ, i.pl.; ## P<0.01, vs. 117OPa 5mg/kg, i.p. + Formalina 5% 20 µ, i.pl.)

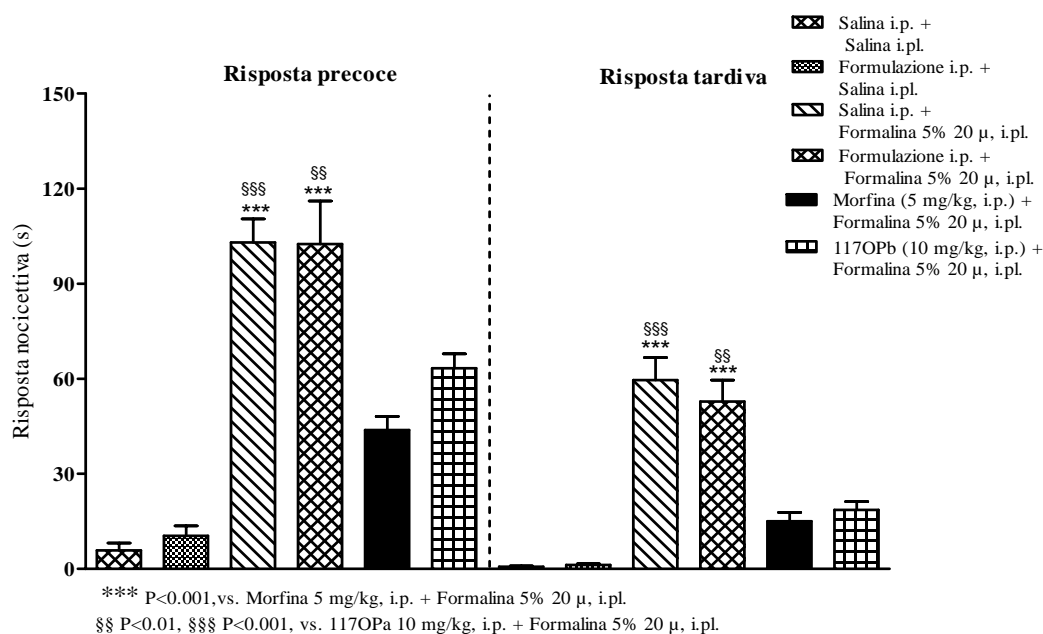


Fig.18 Effetto del veicolo, del veicolo formulato, della morfina (5 mg/kg i.p.) e dell' 117OPb (10 mg/kg i.p.) sul test della formalina. Le colonne rappresentano la media \pm ESM (errore standard medio) della durata in sec della risposta nocicettiva. La significatività statistica è stata calcolata con l'analisi one-way Anova seguita dal test di Tukey (***) $P < 0.001$, vs. Morfina 5 mg/kg, i.p. + Formalina 5% 20 μ , i.pl.; §§ $P < 0.01$, §§§ $P < 0.001$, vs. 117OPa 10 mg/kg, i.p. + Formalina 5% 20 μ , i.pl.)

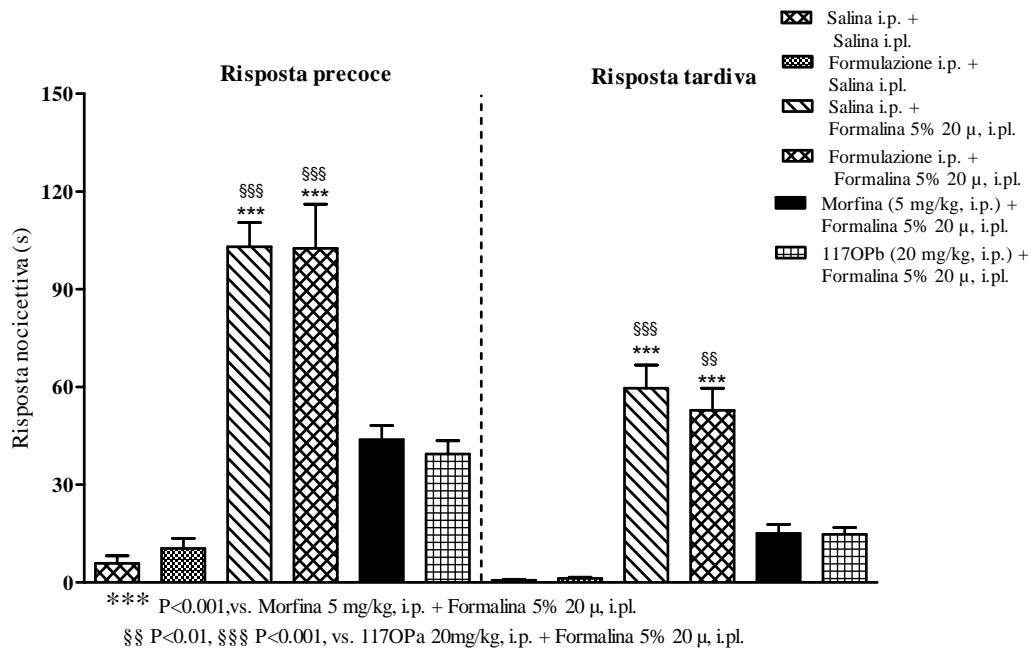


Fig.19 Effetto del veicolo, del veicolo formulato, della morfina (5 mg/kg i.p.) e dell' 117OPb (20 mg/kg i.p.) sul test della formalina. Le colonne rappresentano la media \pm ESM (errore standard medio) della durata in sec della risposta nocicettiva. La significatività statistica è stata calcolata con l'analisi one-way Anova seguita dal test di Tukey (***) $P < 0.001$, vs. Morfina 5 mg/kg, i.p. + Formalina 5% 20 μ , i.pl.; §§ $P < 0.01$, §§§ $P < 0.001$, vs. 117OPa 20mg/kg, i.p. + Formalina 5% 20 μ , i.pl.)

Dolore neuropatico

Il dolore neuropatico è causato da una lesione primaria o da una disfunzione del sistema nervoso. Sono ascrivibili come dolore neuropatico diverse manifestazioni cliniche e sintomatologie molto diverse tra loro. In generale il dolore neuropatico si manifesta come un dolore lancinante oppure avente carattere di bruciore ed è accompagnato da manifestazione sensoriali alterate quali allodinia (risposta dolorosa a uno stimolo non nocicettivo) e iperalgesia (esagerata risposta nocicettiva a stimoli dolorosi di lieve intensità). Diverse patologie possono determinare l'insorgenza di dolore neuropatico ad esempio malattie autoimmuni (sclerosi multipla), malattie metaboliche (diabete), infezioni (nevralgia post erpetica da herpes zoster) infarti e ischemie (Campbell et al. 2006; Hempenstall et al. 2002).

La crescita di rami nervosi collaterali intatti in zone della pelle denervate e la comparsa di scariche ectopiche a partire dai nervi lesi sono tra i meccanismi neurobiologici che portano all'insorgenza di dolore neuropatico. L'insorgenza di scariche ectopiche sembra essere dovuta a una redistribuzione dei canali al sodio nella membrana, a una riduzione dei canali al potassio e al rilascio di mediatori neuroattivi dalle cellule di Schwann denervate. Le scariche ectopiche e l'incremento dell'attività delle fibre lesionate può determinare una sensitizzazione centrale e un aumento dell'eccitabilità dei neuroni delle corna dorsali che si traduce in allodinia e iperalgesia mediata dai recettori NMDA per il glutammato. Sembrerebbe inoltre che anche le fibre intatte siano in grado di promuovere questa sensitizzazione (Campbell et al. 2006; Hempenstall et al. 2002)

Nel dolore neuropatico si osserva la riorganizzazione strutturale delle fibre A β a livello delle corna dorsali causata dal danno alle fibre C. Le fibre A β che normalmente terminano negli strati profondi delle corna dorsali, si ritrovano invece anche a livello della II lamina (Woolf and Wall 1982).

La maggior parte dei modelli sperimentali di dolore neuropatico attualmente utilizzati sfruttano le alterazioni indotte nella sensibilità sensoriale delle zampe posteriori dalla lesione parziale o totale di un nervo periferico (generalmente il nervo sciatico). In particolare viene osservata una iperalgesia a stimoli termici nocicettivi e allodinia a stimoli meccanici.

I tre modelli attualmente più utilizzati sono la costrizione cronica del nervo sciatico (CCI) attraverso legatura a livello della coscia, la legatura parziale del nervo sciatico (PNL) estesa al 33-50% del nervo, lasciando il resto intatto, e la legatura del nervo spinale (SNL). In tutti e tre i modelli si osserva la comparsa di allodinia che risulta più consistente nel SNL. Un modello più recente adattabile anche al topo è quello descritto da Decosterd e Woolf (Decosterd e Woolf 2000, Bourquin et al. 2006), "spared nerve injury model". Il modello determina la comparsa di una forte allodinia e iperalgesia in seguito a legatura della porzione tibiale e peroneale del nervo sciatico lasciando intatta la porzione surale. Questo modello consente di studiare regioni differenti delle zampe posteriori che sono innervate sia da nervi lesionati che non lesionati (Bridge et al 2001).

Spared Nerve Injury (SNI).

Sono stati usati topi maschi CD1 (35-40gr). Una settimana prima dell'inizio della sperimentazione gli animali sono stati alloggiati in gruppi di 20 per gabbia in condizioni di stabulazione standard (temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidità relativa 60%, illuminazione artificiale con ciclo luce buio di 12 ore).

La mononeuropatia è stata indotta in accordo con il modello sperimentale descritto da Decosterd e Woolf (2000). Tale modello è in grado di sviluppare un dolore neuropatico persistente simile a quello percepito dai pazienti affetti da tale disturbo. I topi sono stati anestetizzati con sodio pentobarbital (50 mg / kg, ip). Il nervo sciatico è stato esposto a livello della sua separazione in nervo surale, nervo tibiale

e nervo comune peroneale. I nervi comune peroneale e tibiale sono stati legati saldamente con un filo 5.0 di seta per poi essere sezionati in posizione distale alla legatura, lasciando il nervo surale intatto (Spared Nerve Injury; SNI). I topi del gruppo sperimentale Sham sono stati anestetizzati, il nervo sciatico è stato esposto presso lo stesso livello, ma non legato. La legatura del nervo sviluppa nell'animale uno stato di iperalgesia, ossia una maggiore sensibilità allo stimolo doloroso, e uno stato di allodinia ossia la percezione dolorosa di uno stimolo non doloroso. L'iperalgesia e l'allodinia sono state quantificate tramite una stimolazione termica (Plantar Test) ed una stimolazione meccanica (Dynamic plantar aesthesiometer) della zampa legata.

Valutazione iperalgesia termica.

L'iperalgesia termica è stata valutata a distanza di 14 giorni dalla legatura utilizzando il Plantar Test Apparatus (Ugo Basile, Varese, Italia). Il giorno dell'esperimento ogni animale è stato messo in una gabbia di plastica (22 cm x 17 cm x 14 cm; lunghezza x larghezza x altezza) collocata su un ripiano di vetro. Dopo un periodo di 60 min di abituamento, la superficie plantare della zampa posteriore è stata sottoposta ad un raggio di calore radiante. La fonte di calore radiante consisteva in una lampadina a raggi infrarossi (lampadina alogena Osram bellaphot, 8V, 50 W). Una cella fotoelettrica ha rilevato la luce riflessa dalla zampa, il raggio veniva disattivato in automatico ogni qual volta il movimento della zampa interrompeva la luce riflessa. Il tempo di latenza dopo il ritiro della zampa è stato misurato con una approssimazione di 0,1 s. Per evitare danni ai tessuti il tempo massimo (cut-off time) di stimolazione termica è stato di 20 secondi.

Valutazione della allodinia meccanica.

L'allodinia meccanica è stata quantificata a distanza di 14 giorni dalla legatura utilizzando il Dynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo Basile, Varese, Italia). I topi sono stati posizionati all'interno di compartimenti di plexiglas collocati su un ripiano costituito da una griglia metallica. Dopo un periodo di abituamento di 60 minuti è stato esercitato uno stimolo meccanico sulla superficie plantare delle zampe posteriori del topo. Attraverso la griglia di metallo un filamento automatico in acciaio ha esercitato una forza crescente di 3 grammi al secondo per un tempo massimo di esposizione di 20 secondi. L'allontanamento della zampa dalla fonte di dolore ha determinato l'arresto della misurazione e della quantificazione della risposta (forza in grammi). La forza necessaria per indurre il ritiro della zampa è stata registrata con un'approssimazione di 0,1 g.

Le risposte nocicettive termica e meccanica sono state misurate rispettivamente in secondi e grammi. La risposta basale allo stimolo termico e meccanico è stata determinata 6 giorni prima dell'inizio della

sperimentazione, mentre durante la fase sperimentale i test sono stati effettuati a distanza di 14 giorni dalla chirurgia.

Risultati

Plantar test

L'analisi dei dati effettuata con la one-way Anova seguita dal post test di Tukey ha evidenziato una differenza statisticamente rilevante nella risposta nocicettiva (withdrawal latency) in animali con lesione del nervo sciatico trattati con morfina o con 117OPa rispetto agli animali di controllo ($P \leq 0.05$). Questa risposta è rappresentativa di un effetto analgesico dei due composti. (Fig.20)

Allodynia test

L'analisi dei dati effettuata con la one-way Anova seguita dal post test di Tukey ha evidenziato una differenza statisticamente rilevante nella risposta nocicettiva (mechanical withdrawal threshold) in animali con lesione del nervo sciatico trattati con morfina o con 117OPa rispetto agli animali di controllo. Il post test evidenzia una differenza statisticamente rilevante anche tra gli animali trattati con morfina rispetto a quelli trattati con 117OPa indicando un effetto analgesico maggiore del nuovo composto. (Fig.21)

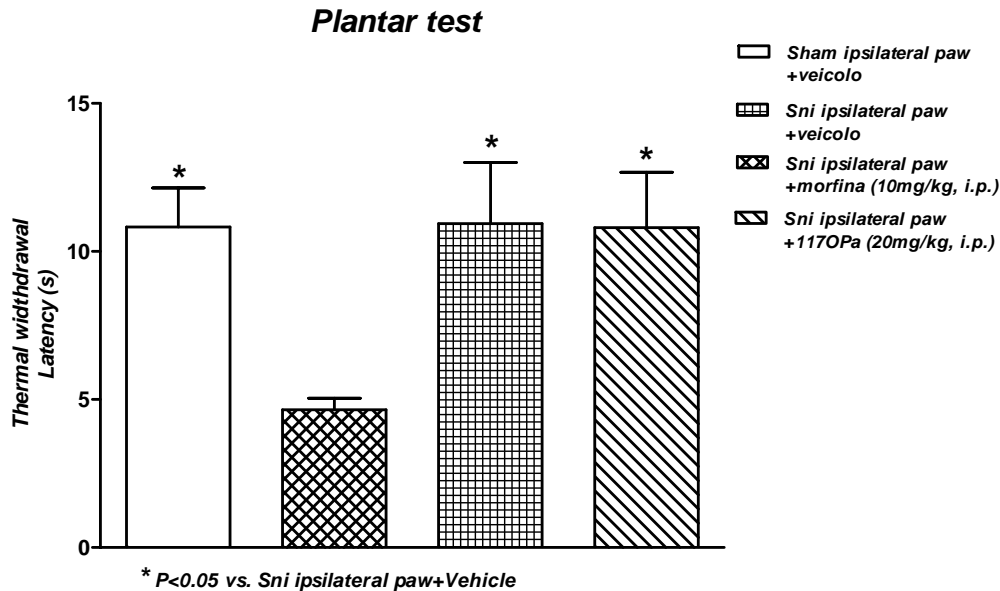


Fig.20 Effetto del veicolo, della morfina e del 117OPa sulla risposta termica nel plantar test in animali con legatura del nervo e sciatico.

Allodynia test

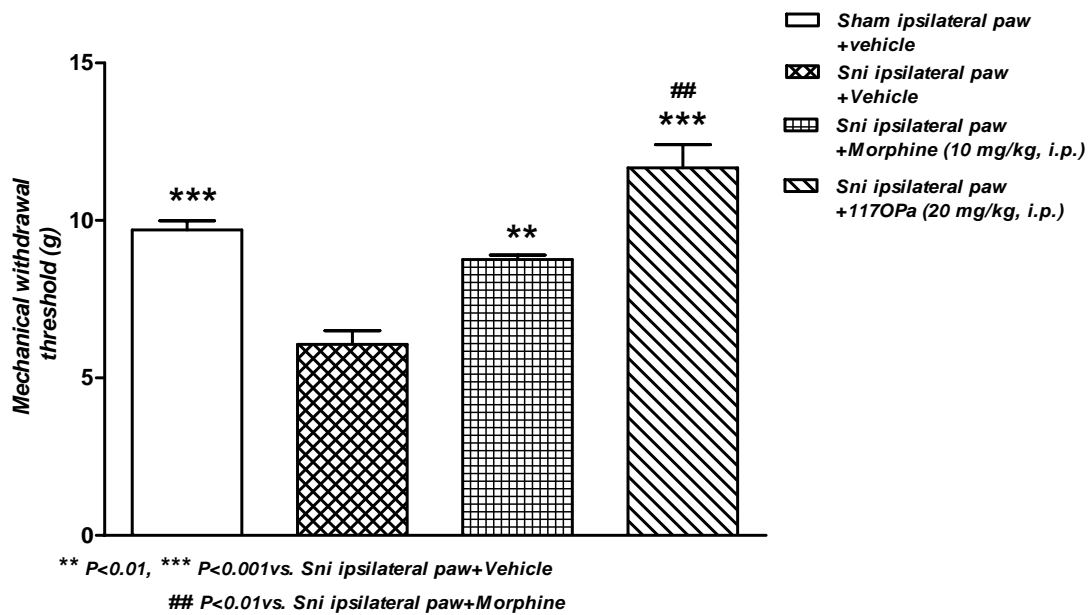


Fig.21 Effetto del veicolo, della morfina e del 117OPa sulla risposta termica nel plantar test in animali con legatura del nervo e sciatico

Microdialisi

La microdialisi è una tecnica analitica quantitativa che consente di valutare i livelli di neurotrasmettitori nelle diverse aree cerebrali attraverso l'uso dell'HPLC (cromatografia liquida ad alte prestazioni). La metodica si basa sul principio della diffusione attraverso una membrana porosa che viene impiantata mediante apposito supporto nell'area cerebrale che interessa studiare; la membrana viene perfusa da una soluzione salina ipotonica di composizione analoga a quella del liquido cefalorachidiano, sotto la spinta di una pompa da microinfusione che mantiene il flusso costante. Le sostanze presenti nel liquido intracerebrale attraversano la membrana secondo gradiente di concentrazione e vengono raccolte dalla soluzione in uscita. Il dializzato viene poi raccolto e iniettato in HPLC dove le sostanze presenti vengono separate e quantificate.

Lo studio è stato effettuato su topi maschi CD1 (Charles River, Italia), gli animali sono stati alloggiati 20 per gabbia in condizioni di stabulazione standard (temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidità relativa 60%, illuminazione artificiale con ciclo luce buio di 12 ore). La sperimentazione è stata condotta secondo le linee guida della Comunità Europea per la sperimentazione animale (EEC n.86/609). I topi sono stati assegnati in maniera casuale a diversi gruppi sperimentali in funzione del farmaco somministrato: veicolo (5ml/kg), morfina (10mg/kg), 117OPa (5,10 o 20mg/kg) e 117OPb (5,10 o 20mg/kg).

Il giorno della chirurgia gli animali, anestetizzati con Equitesin (5ml/kg, intraperitoneale; composizione per 100ml di soluzione: Pentobarbital 0,97g, Solfato di magnesio 2.1g, Cloralio idrato 4.25g, Glicol propilenico 42,8 ml, Etanolo 100% 11.46 ml, H₂O q.b. fino a 100ml totali) sono stati sistemati in uno stereotassico e una fibra da dialisi è stata inserita nella shell del nucleo accumbens secondo le coordinate riportate nell'atlante di Paxinos e Franklin (A.P. = +1.3; L.= +0.5; V . = -5).

La microdialisi è stata eseguita 24-30 ore dopo la chirurgia su topi liberi di muoversi collegati mediante uno swivel a due canali ad una pompa da microinfusione CMA/100. Un fluido cerebrospinale artificiale (NaCl 147 mM, KCl 4mM, CaCl₂1.8 mM, pH 6-6.5) è stato poi infuso attraverso la fibra ad una velocità di 2.2 µl/min. I campioni sono stati raccolti ogni 20 minuti e iniettati in un sistema HPLC munito di colonna Symmetry C-18 3.0 x 150 mm 5 µm e di rivelatore elettrochimico ESA Coulochem II. La fase mobile consisteva in 50mM KH₂PO₄, 0.28mM EDTA, 0.6 mM sodium octyl sulphate (SOS), 12% methanol, pH 4.8. Dopo la stabilizzazione dei valori basali di noradrenalina e dopamina i farmaci sono stati somministrati e i campioni raccolti nelle due ore successive al trattamento.

Risultati

La somministrazione di 117OPa alla dose di 5 e 20mg/kg ha determinato un aumento dei livelli basali di noradrenalina nella shell del nucleo accumbens. Lo stesso effetto può essere osservato anche per la dose di 10mg/kg anche se il dato non ha raggiunto la significatività statistica. Viceversa né la somministrazione di veicolo, né quella di morfina hanno provocato un aumento dei livelli basali di noradrenalina. Il 117OPb a nessuna delle dosi somministrate determina un aumento della noradrenalina rispetto ai livelli basali. La somministrazione di morfina, di 117OPa a 5,10 e 20 mg/kg determina un aumento dei livelli basali di dopamina. L'aumento indotto dalla morfina e dal 117OPa alla dose di 10 e 20mg/kg ha una durata temporale maggiore rispetto a quanto osservato con il 117OPa a 5mg/kg. La somministrazione di 117OPb non determina un aumento dei livelli basali di dopamina a nessuna delle dosi testate.

Noradrenalina

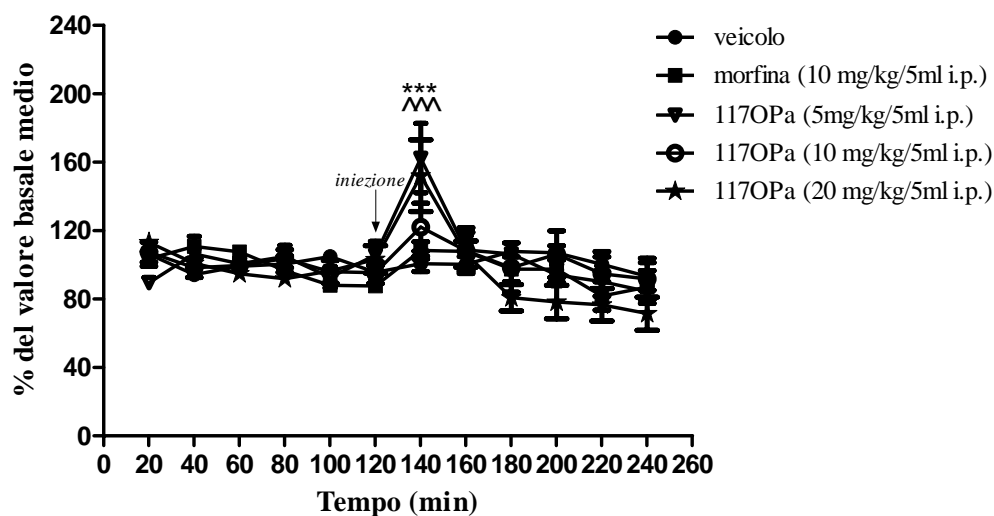


Fig.22 Effetto della somministrazione di veicolo, morfina (10mg/kg) e di diverse dosi di 117OPa (5,10,20 mg/kg) sui livelli basali di noradrenalina nella shell del nucleo accumbens di topo. I dati rappresentano la media \pm ESM e sono espressi come percentuale del valore basale medio. Per l'analisi statistica è stata effettuata la one-way Anova seguita dal test di Bonferroni. (***) $P < 0,001$ esprime la significatività del trattamento con 117OPa a 5mg/kg rispetto al basale a 20 min dal trattamento), (^^^) $P < 0,001$ esprime la significatività del trattamento con 117OPa a 20 mg/kg rispetto al basale a 20 min dal trattamento).

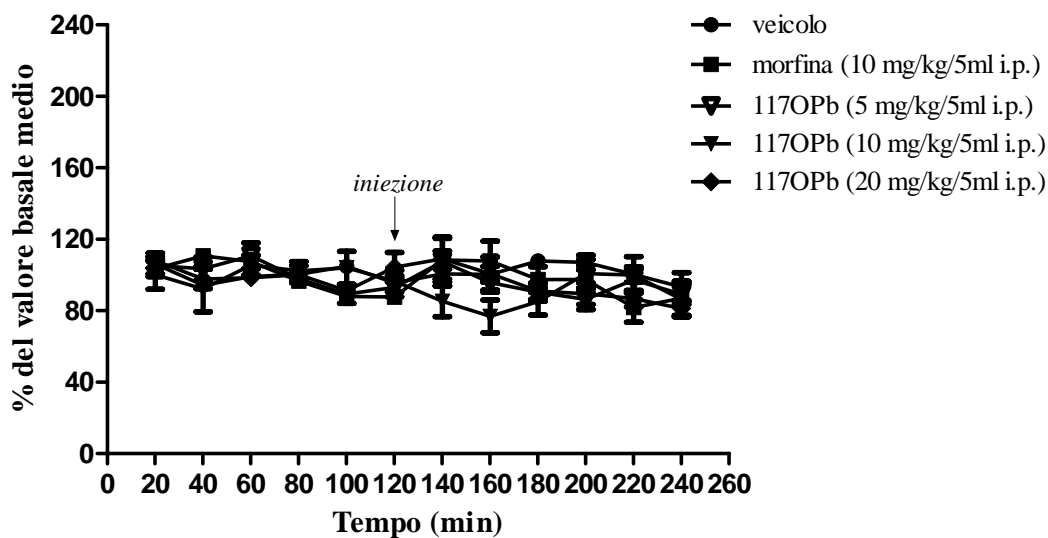


Fig.23 Effetto della somministrazione di veicolo, morfina (10mg/kg) e di diverse dosi di 117OPb (5,10,20 mg/kg) sui livelli basali di noradrenalina nella shell del nucleo accumbens di topo. I dati rappresentano la media \pm ESM e sono espressi come percentuale del valore basale medio.

Dopamina

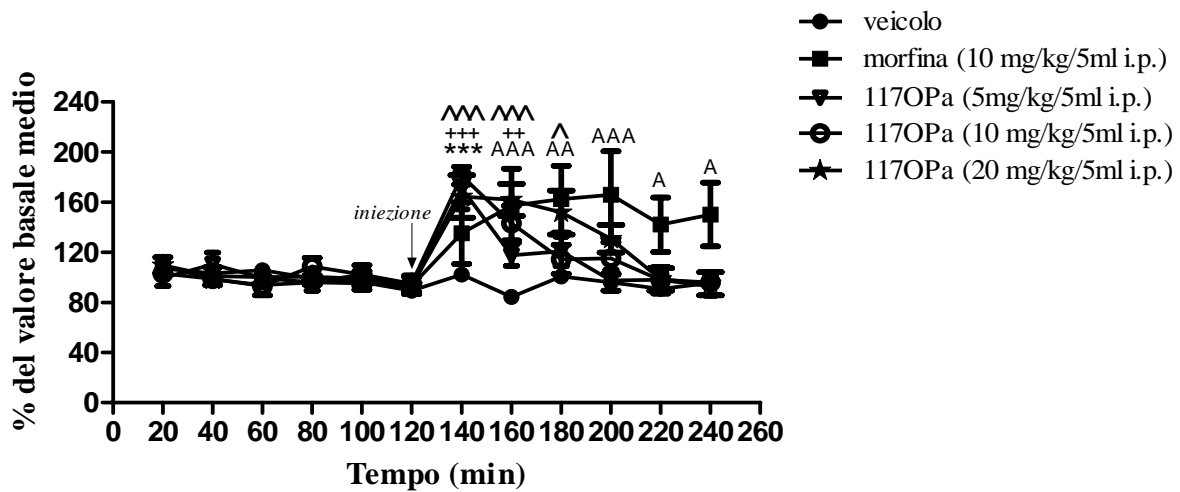


Fig.24 Effetto della somministrazione di veicolo, morfina (10mg/kg) e di diverse dosi di 117OPa (5,10,20 mg/kg) sui livelli basali di dopamina nella shell del nucleo accumbens di topo. I dati sono espressi come percentuale del valore basale medio \pm ESM. Per l'analisi statistica è stata effettuata la two-way Anova seguita dal test di Bonferroni. (A $P < 0,05$ AAP $< 0,01$ AAAP $< 0,001$ esprime la significatività del trattamento con morfina rispetto al livello basale; *** $P < 0,001$ esprime la significatività del trattamento con 117OPa a 5mg/kg rispetto al basale; ++ $P < 0,01$ e +++ $P < 0,001$ del trattamento con 117OPa 10mg/kg rispetto al basale e ^ $P < 0,05$ e ^^ $P < 0,001$ esprime la significatività del trattamento con 117OPa a 20 mg/kg rispetto al basale)

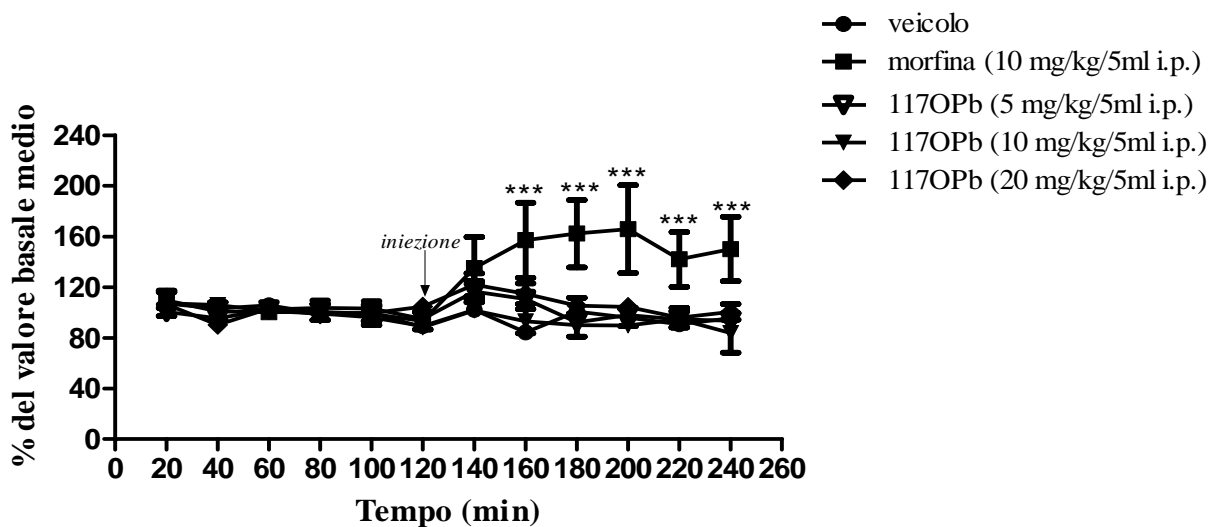


Fig.25 Effetto della somministrazione di veicolo, morfina (10mg/kg) e di diverse dosi di 117OPb (5,10,20 mg/kg) sui livelli basali di dopamina nella shell del nucleo accumbens di topo. I dati sono espressi come percentuale del valore basale medio \pm ESM. Per l'analisi statistica è stata effettuata la two-way Anova seguita dal test di Bonferroni. *** $P < 0,001$ esprime la significatività del trattamento con morfina rispetto al veicolo).

Il 117OPa sembra avere un profilo farmacologico sovrapponibile a quello della morfina anche per ciò che riguarda il rilascio di noradrenalina e dopamina nella shell del nucleo accumbens. Considerando il ruolo della noradrenalina nella sindrome d'astinenza questo risultato lascia supporre un'analogia capacità

del 117OPa rispetto alla morfina di indurre allostasi e quindi di innescare i meccanismi che portano alla dipendenza fisica. L'effetto del 117OPa sul rilascio di dopamina lascia supporre un analogo potere di rinforzo e pertanto un potenziale d'abuso paragonabile.

Il 117OPb mostra invece un profilo diverso. A parità di effetto analgesico, il fatto che non aumenti il rilascio di noradrenalina e dopamina lo rende interessante per ciò che concerne la sfera degli effetti collaterali descritti. Si è pertanto proceduto con la valutazione dell'effetto della somministrazione sub cronica di 117OPb (7 giorni). L'effetto è stato paragonato a quello della morfina. La somministrazione sub-cronica di morfina determina la comparsa di meccanismi adattativi che si traducono in una crisi di astinenza quando viene somministrato il naloxone. I sintomi rilevabili nel topo sono piloerezione, pulizia dei genitali, tremore delle zampe e salti.

Per indurre la dipendenza fisica sono stati proposti diversi modelli di trattamento con morfina. In generale nel topo si preferisce la somministrazione ripetuta di dosi crescenti di morfina una o due volte al giorno (Fadda et al.1997; Broseta et al.2002). Nel nostro studio i topi sono stati trattati con dosi crescenti di morfina o di 117OPb (da 10mg/kg del giorno 1 fino a 100mg/kg del giorno 7 per due volte al giorno).

Il giorno 6 gli animali sono stati anestetizzati con Equitesin e la fibra è stata inserita nella shell del nucleo accumbens (come descritto in precedenza). La microdialisi è stata eseguita come descritto in precedenza, 24-30 ore dopo. I valori basali sono stati monitorati per 2h (6 campioni basali), gli animali sono poi stati trattati con morfina o 117OPb (100mg/kg) e seguiti per 1h (3 campioni). Infine sono stati trattati con naloxone (5mg/kg) o con veicolo. I campioni sono stati raccolti ogni 20min per un totale di 2h dal trattamento. Nei 20 min successivi al trattamento con naloxone o con veicolo gli animali sono stati osservati per la valutazione dei sintomi d'astinenza.

Risultati

La somministrazione intraperitoneale di morfina e di 117OPb al giorno 7 su topi provenienti da trattamento sub-cronico nei sei giorni precedenti ha determinato un incremento dei livelli di noradrenalina rispetto ai livelli basali a distanza di 20 min dal trattamento. Tale effetto è protratto nel tempo per ciò che riguarda gli animali trattati con morfina, mentre ritorna ai livelli basali nei topi trattati con 117OPb. Il veicolo e il naloxone non hanno alcun effetto sui livelli basali di noradrenalina.

Il naloxone antagonizza l'effetto della morfina dopo 40 min dalla somministrazione riportando i livelli di noradrenalina al valore basale. Nei topi trattati con veicolo i livelli si mantengono invece elevati.

L'effetto sui livelli di dopamina presenta lo stesso andamento. Si osserva un aumento dei livelli basali a distanza di 20 min dal trattamento nei topi a cui è stata somministrata morfina o 117OPb. Tale effetto resta significativo nel tempo nei topi trattati con morfina mentre non è più riscontrabile nei topi trattati

con 117OPb. La somministrazione di naloxone antagonizza l'aumento dei livelli di dopamina indotto dalla morfina. Il veicolo e il naloxone non hanno alcun effetto sui livelli basali di dopamina .

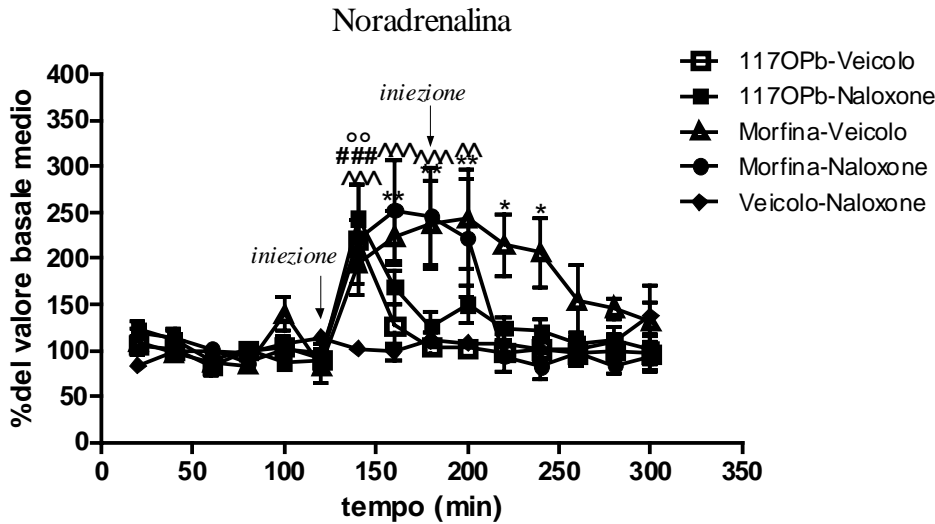


Fig.26 Effetto del naloxone o del veicolo sul rilascio di noradrenalina indotto dal trattamento sub-cronico con morfina, 117OPb o veicolo nella shell del nucleo accumbens. I dati sono espressi come percentuale del valore basale medio \pm ESM. Per l'analisi statistica è stata effettuata la one-way Anova seguita dal test di Bonferroni. (* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ esprime la significatività del trattamento con morfina-veicolo rispetto a veicolo-naloxone; ^^ $P < 0.01$ e ^^^ $P < 0.001$ del trattamento con morfina-naloxone rispetto a veicolo-naloxone; °° $P < 0.01$ del trattamento con 117OPb-veicolo rispetto a veicolo-naloxone; ### $P < 0.001$ del trattamento con 117OPb-naloxone rispetto a veicolo-naloxone).

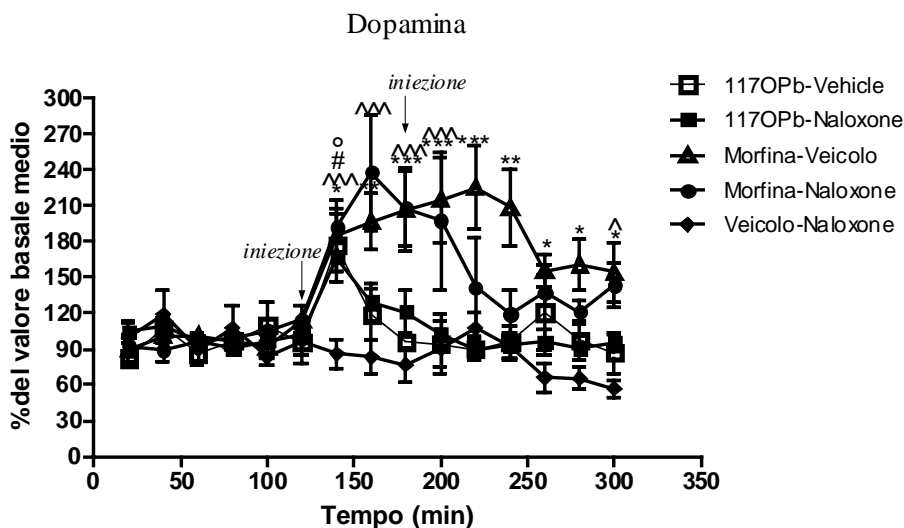


Fig.27 Effetto del naloxone o del veicolo sul rilascio di dopamina indotto dal trattamento sub-cronico con morfina, 117OPb o veicolo nella shell del nucleo accumbens. I dati sono espressi come percentuale del valore basale medio \pm ESM. Per l'analisi statistica è stata effettuata la one-way Anova seguita dal test di Bonferroni. (* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ esprime la significatività del trattamento con morfina-veicolo rispetto a veicolo-naloxone; ^ $P < 0.05$ e ^^^ $P < 0.001$

del trattamento con morfina-naloxone rispetto a veicolo-naloxone; ° P<0.05 del trattamento con 117OPb-veicolo rispetto a veicolo-naloxone; # P<0.05 del trattamento con 117OPb-naloxone rispetto a veicolo-naloxone).

Valutazione comportamentale dei sintomi di astinenza

I sintomi della crisi di astinenza rilevati nel nostro modello sperimentale sono stati i salti, il tremore delle zampe e la pulizia generale. Tale sintomatologia è stata riscontrata solo negli animali in regime sub cronico con morfina a cui è stato somministrato il naloxone. Nei topi trattati con 117OPb la somministrazione di naloxone non ha causato la comparsa di sintomi di astinenza, fatta eccezione per la pulizia generale che è stata osservata anche in questo gruppo sperimentale.

L'analisi dei dati è stata effettuata con il test one-way Anova seguita dal post test di Bonferroni.

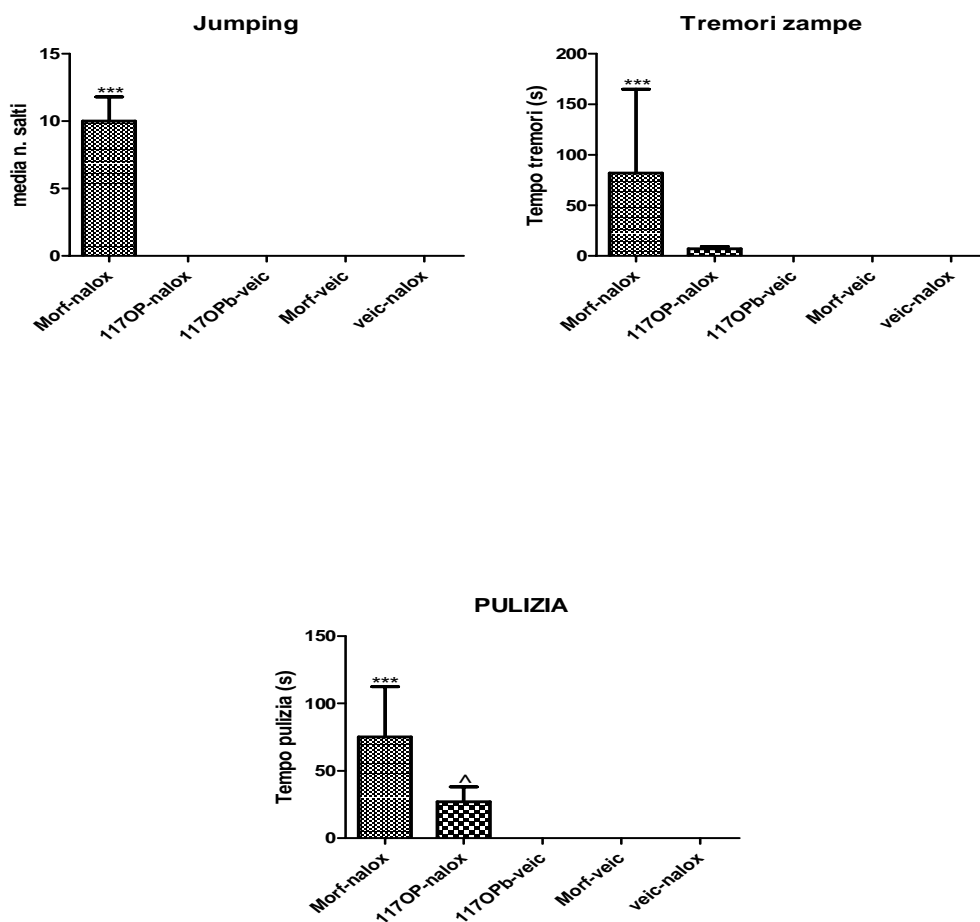


Fig.28 Effetto della somministrazione di naloxone o di veicolo in animali sotto regime sub cronico di morfina o di 117OPb. L'analisi dei dati è stata effettuata con il test one-way Anova seguita dal post test di Bonferroni. (***)P<0.001, # P<0.05).

Discussione e conclusioni

I due composti 117OPa e 117OPb sono dei derivati di nonani diazabicyclici con anello principale omopiperazolico. Dagli studi di affinità recettoriale è emerso che entrambi i composti possiedono un'affinità per i recettori μ e δ inferiore a quella della morfina, mentre per ciò che riguarda il profilo sui recettori κ il 117OPb presenta un'affinità superiore a quella della morfina.

La valutazione dell'attività intrinseca dei due composti sui recettori μ è stata effettuata utilizzando una linea cellulare di neuroblastoma umano, SH-SY5Y, che esprime selettivamente questo tipo di recettore. Il recettore μ per gli oppioidi è un recettore di membrana accoppiato a proteine G (GPCRs). Tra i processi intracellulari avviati dalla stimolazione delle proteine G, si ha l'attivazione della via delle protein-chinasi tramite fattori mitogeni (Mitogen-activated protein kinase – MAPK) (Coonse et al, 2007). Le chinasi sono attivate per fosforilazione sia di residui di tirosina che di treonina catalizzate da specifiche chinasi (MKK). Le MAPK attivate fosforilano i loro specifici substrati sui residui serinici o treoninici portando infine all'attivazione di diversi fattori di trascrizione. Le Erk appartengono alla famiglia delle MAPK e sono tra i siti bersaglio della cascata di fosforilazioni indotte dall'attivazione delle proteine G. L'esposizione della linea cellulare a 117OPa e 117OPb determina in entrambi i casi la fosforilazione delle proteine Erk indicando una modulazione positiva del recettore μ . L'attività intrinseca del 117OPb sui recettori κ è in fase di studio.

Lo studio del profilo analgesico è stato effettuato sul dolore acuto, tramite i test del tail-flick e dell'hot-plate, sul dolore neurogenico e infiammatorio con il test della formalina e sul dolore neuropatico tramite il test SNI (spared nerve injury).

La risposta misurata nel test dell'hot-plate è indicativa di un effetto analgesico mediato prevalentemente a livello centrale (Couto et al. 2010; Yaksh and Rudy, 1976; Yaksh and Rudy, 1977). Entrambi i composti manifestano un marcato effetto analgesico dose dipendente nell'hot-plate quindi l'effetto analgesico si esplica a livello soprasspinale.

La conferma di un effetto analgesico mediato a livello centrale si è avuta con il test della formalina. La risposta all'iniezione di formalina ha un andamento bifasico. La prima fase è rappresentativa di un dolore nocicettivo acuto e risponde agli analgesici oppioidi. La seconda fase è rappresentativa di una risposta infiammatoria, è mediata dai classici mediatori dell'infiammazione e risponde ai FANS. I composti che agiscono a livello centrale sono efficaci sia nella prima che nella seconda fase, mentre quelli che agiscono a livello periferico hanno un effetto positivo solo nella seconda fase (Couto et al. 2010; Abram and Olson, 1994; Manning e Franklin, 1998; Rosland et al., 1990; Yamamoto et al., 2002). Ne consegue che il 117OPa e il 117OPb mostrano un profilo analgesico riconducibile ad una risposta mediata a livello centrale. Inoltre il risultato positivo ottenuto nel test del tail-flick indica che entrambi i composti sono efficaci anche a livello periferico.

Per il 117OPa tale effetto è mediato dai recettori per gli oppioidi perché viene antagonizzato dalla preventiva somministrazione di naloxone. Considerando l'affinità recettoriale, i recettori oppioidi mediano verosimilmente anche l'azione analgesica del 117OPb ma lo studio è ancora in svolgimento. L'effetto analgesico del 117OPa, così come quello della morfina, va incontro a tolleranza. Dopo 4 giorni consecutivi di trattamento non è più rilevabile. Per il 117OPb questo aspetto è ancora in fase di valutazione.

Per valutare l'attività analgesica sul dolore neuropatico è stato utilizzato il modello SNI (spared nerve injury model). L'SNI è un modello di danno nervoso periferico introdotto da Decosterd e Woolf (Decosterd e Woolf 2000). La procedura sperimentale è abbastanza semplice e riproducibile, e consiste nella legatura dei nervi tibiale e peroneale del nervo sciatico lasciando intatto il nervo surale. Questo modello consente di studiare le variazioni indotte dalla legatura sia sulle popolazioni neuronali danneggiate che nei neuroni sensoriali intatti adiacenti. La legatura produce una consistente allodinia meccanica e termica e un'iperalgisia meccanica che si sviluppano durante la prima settimana e persistono durante i mesi successivi (fino a 6 mesi). L'efficacia dei farmaci oppioidi sul dolore neuropatico nella pratica clinica e nella maggior parte dei modelli animali è abbastanza controversa. Erichsen e Blackburn-Munro hanno però dimostrato l'efficacia di dosi analgesiche e non sedative di morfina nel modello SNI (Erichsen e Blackburn-Munro 2002). In altri modelli animali di legatura parziale è stato osservato sia un aumento che una diminuzione dei recettori μ a livello spinale (Besse et al., 1992; Goff et al., 1998; Porreca et al., 1998). L'effetto duraturo della morfina nel modello SNI lascia supporre un aumento dei recettori μ sia pre- che post-sinaptici a livello delle fibre afferenti primarie (Erichsen e Blackburn-Munro 2002) anche se altri meccanismi, quali l'attivazione prolungata delle chinasi, potrebbero essere coinvolti (Gutstein et al., 1997).

Il nostro studio ha confermato l'efficacia della morfina nel prevenire l'allodinia meccanica e l'iperalgisia termica nel modello SNI. Tale effetto positivo sul dolore neuropatico è stato osservato anche per il 117OPa, che ha manifestato un effetto analgesico superiore a quello della morfina nel prevenire l'allodinia meccanica. Considerata l'affinità recettoriale inferiore e il fatto che negli altri test l'effetto del 117OPa è paragonabile a quello della morfina, la ragione di questo effetto è attualmente sconosciuta. Lo studio sul 117OPb è in corso.

La somministrazione dei due composti sotto forma di microemulsione ha verosimilmente consentito una maggiore biodisponibilità dei due principi attivi a livello dei siti bersaglio. Infatti dai risultati di affinità recettoriale ottenuti con gli studi di binding si può ipotizzare che per ottenere un effetto farmacologico paragonabile a quello della morfina, i due composti dovrebbero essere somministrati a dosi circa 10 volte superiori. L'effetto compare invece a parità di dose o, nel caso del 117OPb nell'hot-

plate a una dose più bassa rispetto a quella della morfina. Lo studio deve comunque essere completato per valutare la potenza dei due composti.

Gli studi di microdialisi confermano per il 117OPa un profilo farmacologico simile a quello della morfina, infatti esso determina un aumento dei livelli di dopamina nella shell del nucleo accumbens.

Lo studio con il 117OPa non ha quindi portato evidenze di un profilo migliore rispetto alla morfina.

Il 117OPb, invece, presenta un profilo differente. Dopo somministrazione di una singola dose non provoca aumento dei livelli basali di noradrenalina e di dopamina. Un leggero aumento si osserva dopo la somministrazione in regime di trattamento sub-cronico, ma l'aumento indotto ha una durata temporale inferiore rispetto alla morfina. Diversamente dalla morfina il trattamento sub-cronico con 117OPb non determina l'insorgenza di una sintomatologia riconducibile a una crisi di astinenza in seguito alla somministrazione di naloxone.

A parità di effetto analgesico il 117OPb (ancora in fase di valutazione per il dolore neuropatico) presenta, rispetto alla morfina, un profilo più vantaggioso dal punto di vista di alcuni degli effetti collaterali (che devono essere ulteriormente valutati mediante il test della *self-administration* e della *place-preference*). Sebbene sia necessario condurre ulteriori studi si può ipotizzare che l'effetto sulla dopamina e di conseguenza il suo possibile ridotto potenziale d'abuso, e l'effetto sulla noradrenalina e quindi la capacità di attenuare i sintomi di astinenza, sia dovuto alla modulazione dei recettori κ .

L'effetto degli agonisti oppioidi è diverso a seconda del tipo di recettore che viene maggiormente modulato. In generale la somministrazione sistemica di agonisti dei recettori μ e δ determina analgesia, euforia e benessere mentre la somministrazione di agonisti per i recettori κ determina miosi sedazione e disforia (Gourlay 2005).

E' stato dimostrato che la somministrazione prolungata di oppioidi e di sostanze d'abuso in generale determina un adattamento del sistema dinorfinergico che inizialmente servirebbe a contrastare l'iperattivazione del sistema oppioidergico mediato dai recettori μ (Bruijnzeel 2009).

La stimolazione dei recettori κ modula alcuni degli effetti comportamentali indotti dalla morfina. Gli agonisti κ riducono l'auto-somministrazione di morfina in ratti e topi a dosi che non modificano l'auto-somministrazione di acqua (Glick et al., 1995; Kuzmin et al., 1997). Inoltre tali agonisti prevengono la *place-preference* condizionata, indotta dalla morfina a dosi che di per se non inducono *place-aversion* (Bolanos et al., 1996; Funada et al., 1993). In generale quindi gli agonisti per i recettori κ riducono il potere gratificante della morfina. A livello neurochimico questo è supportato da evidenze sperimentali che dimostrano l'esistenza di un controllo oppioidergico sul sistema dopaminergico mesolimbico. In particolare si ritiene che l'attivazione dei recettori κ situati a livello presinaptico sui neuroni dopaminergici della VTA determina una riduzione del rilascio di dopamina. Viceversa l'attivazione dei recettori μ situati sugli interneuroni GABAergici nella VTA, riducendo il tono inibitorio che questi

neuroni esercitano sui neuroni dopaminergici che proiettano nel nucleo accumbens, determina un aumento del rilascio di dopamina (Spanagel et al. 1992).

Gli agonisti dei recettori κ sembrano avere un ruolo fondamentale anche nel ridurre i sintomi della crisi d'astinenza da oppioidi. Diversi studi riportano che la dinorfina B previene i sintomi dell'astinenza sia negli animali che nell'uomo (Tulunay et al., 1981; Wen et al., 1984; Wen and Ho, 1982), mentre l'antagonista κ nor-binaltorfimina (nor-BNI) potenzia sia i sintomi d'astinenza che la *place-aversion* indotta dal naloxone in animali dipendenti da morfina (Spanagel et al., 1994).

Si ritiene che i sintomi affettivi e somatici della crisi d'astinenza siano in parte mediati da un aumento dell'attività noradrenergica. E' stato pertanto ipotizzato che gli agonisti dei recettori κ attenuano i sintomi d'astinenza riducendo il rilascio di noradrenalina. Questo effetto sarebbe mediato dall'inibizione di canali al calcio di tipo N (Tallent et al., 1994).

Nella pratica clinica l'utilizzo di agonisti dei recettori κ è stato fortemente limitato dalle loro proprietà disforiche. Per tale ragione nonostante le evidenti proprietà analgesiche l'uso è stato limitato a composti che non attraversano la barriera emato-encefalica e hanno pertanto un'azione analgesica esclusivamente periferica. FE200041 (D-Phe-D-Phe-DNle-D-Arg-NH₂) è un agonista selettivo per i recettori κ che si è rivelato efficace in modelli di dolore infiammatorio e viscerale senza effetti collaterali a livello centrale. Altri due agonisti κ , FE 200665 and FE 200666, si sono rivelati analgesici periferici altrettanto efficaci (Vanderah 2010).

Il 117OPb presenta una buona affinità sia per i recettori μ (K_i 5,7±1 nM) che per i recettori κ (K_i 55 ± 5 nM). L'effetto analgesico riscontrato nell'hot-plate è indicativo di un'azione a livello centrale e, sebbene sia necessario approfondire lo studio con test comportamentali appropriati, questo effetto non è accompagnato da sintomi evidenti di disforia tipici dell'agonismo sui recettori κ a livello centrale. Questo potrebbe derivare dall'azione combinata sui recettori μ e κ che si tradurrebbe in un potere analgesico paragonabile a quello della morfina, ma con effetti collaterali ridotti. Un unico composto dotato quindi di azione analgesica sia centrale che periferica, ma con pochi effetti collaterali.

In conclusione, per quanto sia fondamentale approfondire e completare lo studio, questi risultati offrono comunque buone prospettive, e se venissero confermati da ulteriori esperimenti e riprodotti nell'uomo porrebbero le basi per un eventuale impiego del 117OPb come sostituto della morfina nella terapia del dolore anche nella pratica clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. Abram SE, Olson EE (1994). Systemic opioids do not suppress spinal sensitization after subcutaneous formalin in rats. *Anesthesiology* 80:1114-1119.
2. Bailey CP, Kelly E, Henderson G (2004). Protein kinase C activation enhances morphine-induced rapid desensitization of mu-opioid receptors in mature rat locus ceruleus neurons. *Mol Pharmacol* 66:1592-1598.
3. Ballantyne JC, Shin NS (2008). Efficacy of opioids for chronic pain: a review of the evidence. *Clin J Pain* 24:469-478.
4. Bannon AW, Malmberg AB (2007). Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8:Unit.
5. Bekhit MH (2010). Opioid-induced hyperalgesia and tolerance. *Am J Ther* 17:498-510.
6. Benyamin R, Trescot AM, Datta S, Buenaventura R, Adlaka R, Sehgal N, Glaser SE, Vallejo R (2008). Opioid complications and side effects. *Pain Physician* 11:S105-S120.
7. Berger AC, Whistler JL (2010). How to design an opioid drug that causes reduced tolerance and dependence. *Ann Neurol* 67:559-569.
8. Besse D, Lombard MC, Perrot S, Besson JM (1992). Regulation of opioid binding sites in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord following loose ligation of the sciatic nerve: comparison with sciatic nerve section and lumbar dorsal rhizotomy. *Neuroscience* 50:921-933.
9. Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG (2000). Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 408:720-723.
10. Bolanos CA, Garmsen GM, Clair MA, McDougall SA (1996). Effects of the kappa-opioid receptor agonist U-50,488 on morphine-induced place preference conditioning in the developing rat. *Eur J Pharmacol* 317:1-8.
11. Bourquin AF, Suveges M, Pertin M, Gilliard N, Sardy S, Davison AC, Spahn DR, Decosterd I (2006). Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. *Pain* 122:14.

12. Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10:287-333.
13. Broseta I, Rodriguez-Arias M, Stinus L, Minarro J (2002). Ethological analysis of morphine withdrawal with different dependence programs in male mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:335-347.
14. Bruijnzeel AW (2009). kappa-Opioid receptor signaling and brain reward function. *Brain Res Rev* 62:127-146.
15. Burgess G, Williams D (2010). The discovery and development of analgesics: new mechanisms, new modalities. *J Clin Invest* 120:3753-3759.
16. Cami J, Farre M (2003). Drug addiction. *N Engl J Med* 349:975-986.
17. Campbell JN, Meyer RA (2006). Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 52:77-92.
18. Carinci AJ, Mao J (2010). Pain and opioid addiction: what is the connection? *Curr Pain Headache Rep* 14:17-21.
19. Chen BT, Hopf FW, Bonci A (2010). Synaptic plasticity in the mesolimbic system: therapeutic implications for substance abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1187:129-139.
20. Christo PJ, Mazloomdoost D (2008). Cancer pain and analgesia. *Ann N Y Acad Sci* 1138:278-298.
- 21.Coderre TJ, Melzack R (1992). The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci* 12:3665-3670.
22. Coonse KG, Coonts AJ, Morrison EV, Heggland SJ (2007). Cadmium induces apoptosis in the human osteoblast-like cell line Saos-2. *J Toxicol Environ Health A* 70:575-581.
23. Couto VM, Vilela FC, Dias DF, Dos Santos MH, Soncini R, Nascimento CG, Giusti-Paiva A (2010). Antinociceptive effect of extract of Emilia sonchifolia in mice. *J Ethnopharmacol*.
24. Decosterd I, Woolf CJ (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.
25. Erichsen HK, Blackburn-Munro G (2002). Pharmacological characterisation of the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Pain* 98:151-161.

26. Fadda P, Barlocco D, Tronci S, Cignarella G, Fratta W (1997). Antinociceptive action of DBO 17 and DBO 11 in mice: two 3,8 diazabicyclo (3.2.1.) octane derivatives with selective mu opioid receptor affinity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356:596-602.
27. Fishbain D, Johnson S, Webster L, Greene L, Faysal J (2010). Review of regulatory programs and new opioid technologies in chronic pain management: balancing the risk of medication abuse with medical need. *J Manag Care Pharm* 16:276-287.
28. Funada M, Suzuki T, Narita M, Misawa M, Nagase H (1993). Blockade of morphine reward through the activation of kappa-opioid receptors in mice. *Neuropharmacology* 32:1315-1323.
29. Glick SD, Maisonneuve IM, Raucci J, Archer S (1995). Kappa opioid inhibition of morphine and cocaine self-administration in rats. *Brain Res* 681:147-152.
30. Goff JR, Burkey AR, Goff DJ, Jasmin L (1998). Reorganization of the spinal dorsal horn in models of chronic pain: correlation with behaviour. *Neuroscience* 82:559-574.
31. Golembiewski J, Rakic AM (2010). Opioids. *J Perianesth Nurs* 25:258-260.
32. Gourlay D (2005). Addiction and pain medicine. *Pain Res Manag* 10 Suppl A:38A-43A.
33. Grecksch G, Bartzsch K, Widera A, Becker A, Hollt V, Koch T (2006). Development of tolerance and sensitization to different opioid agonists in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 186:177-184.
34. Gutstein HB, Rubie EA, Mansour A, Akil H, Woodgett JR (1997). Opioid effects on mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Anesthesiology* 87:1118-1126.
35. Hempenstall K, Rice AS (2002). Current treatment options in neuropathic pain. *Curr Opin Investig Drugs* 3:441-448.
36. Hummel M, Lu P, Cummons TA, Whiteside GT (2008). The persistence of a long-term negative affective state following the induction of either acute or chronic pain. *Pain* 140:436-445.
37. Johnson SW, North RA (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12:483-488.

38. Joseph MH, Datla K, Young AM (2003). The interpretation of the measurement of nucleus accumbens dopamine by in vivo dialysis: the kick, the craving or the cognition? *Neurosci Biobehav Rev* 27:527-541.
39. Kuzmin AV, Semenova S, Gerrits MA, Zvartau EE, Van Ree JM (1997). Kappa-opioid receptor agonist U50,488H modulates cocaine and morphine self-administration in drug-naive rats and mice. *Eur J Pharmacol* 321:265-271.
40. Lane-Ladd SB, Pineda J, Boundy VA, Pfeuffer T, Krupinski J, Aghajanian GK, Nestler EJ (1997). CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *J Neurosci* 17:7890-7901.
41. Lawrence MJ, Rees GD (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 45:89-121.
42. Lelevich SV, Lelevich VV, Novokshonov AA (2009). Neurotransmitter mechanisms of morphine withdrawal syndrome. *Bull Exp Biol Med* 148:184-187.
43. Liu JG, Anand KJ (2001). Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Brain Res Rev* 38:1-19.
44. Ma W, Zheng WH, Powell K, Jhamandas K, Quirion R (2001). Chronic morphine exposure increases the phosphorylation of MAP kinases and the transcription factor CREB in dorsal root ganglion neurons: an in vitro and in vivo study. *Eur J Neurosci* 14:1091-1104.
45. Manchikanti L, Fellows B, Ailinani H, Pampati V (2010). Therapeutic use, abuse, and nonmedical use of opioids: a ten-year perspective. *Pain Physician* 13:401-435.
46. Manning BH, Franklin KB (1998). Morphine analgesia in the formalin test: reversal by microinjection of quaternary naloxone into the posterior hypothalamic area or periaqueductal gray. *Behav Brain Res* 92:97-102.
47. Mao J, Price DD, Mayer DJ (1995). Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. *Pain* 62:259-274.
48. Marshall CJ (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185.

49. Martindale JL, Holbrook NJ (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192:1-15.
50. Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD (1999). Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7731-7736.
51. Nestler EJ (1996). Under siege: The brain on opiates. *Neuron* 16:897-900.
52. Nestler EJ (1997). Molecular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Curr Opin Neurobiol* 7:713-719.
53. Omoigui S (2007). The biochemical origin of pain: the origin of all pain is inflammation and the inflammatory response. Part 2 of 3 - inflammatory profile of pain syndromes. *Med Hypotheses* 69:1169-1178.
54. Pergolizzi J, Boger RH, Budd K, Dahan A, Erdine S, Hans G, Kress HG, Langford R, Likar R, Raffa RB, Sacerdote P (2008). Opioids and the management of chronic severe pain in the elderly: consensus statement of an International Expert Panel with focus on the six clinically most often used World Health Organization Step III opioids (buprenorphine, fentanyl, hydromorphone, methadone, morphine, oxycodone). *Pain Pract* 8:287-313.
55. Porreca F, Tang QB, Bian D, Riedl M, Elde R, Lai J (1998). Spinal opioid mu receptor expression in lumbar spinal cord of rats following nerve injury. *Brain Res* 795:197-203.
56. Przewlocki R, Przewlocka B (2001). Opioids in chronic pain. *Eur J Pharmacol* 429:79-91.
57. Rosland JH, Tjolsen A, Maehle B, Hole K (1990). The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 42:235-242.
58. Sheu MY, Fowler AJ, Kao J, Schmuth M, Schoonjans K, Auwerx J, Fluhr JW, Man MQ, Elias PM, Feingold KR (2002). Topical peroxisome proliferator activated receptor-alpha activators reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models. *J Invest Dermatol* 118:94-101.
59. Shippenberg TS (2009). The dynorphin/kappa opioid receptor system: a new target for the treatment of addiction and affective disorders? *Neuropsychopharmacology* 34:247.
60. Shurman J, Koob GF, Gutstein HB (2010). Opioids, pain, the brain, and hyperkatifeia: a framework for the rational use of opioids for pain. *Pain Med* 11:1092-1098.

61. Sklair-Tavron L, Shi WX, Lane SB, Harris HW, Bunney BS, Nestler EJ (1996). Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11202-11207.
62. Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS (1992). Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2046-2050.
63. Spanagel R, Almeida OF, Bartl C, Shippenberg TS (1994). Endogenous kappa-opioid systems in opiate withdrawal: role in aversion and accompanying changes in mesolimbic dopamine release. *Psychopharmacology (Berl)* 115:121-127.
64. 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. *Neuroscience* 63:1033-1040.
65. Tulunay FC, Jen MF, Chang JK, Loh HH, Lee NM (1981). Possible regulatory role of dynorphin on morphine- and beta-endorphin-induced analgesia. *J Pharmacol Exp Ther* 219:296-298.
66. Vanderah TW (2010). Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain. *Clin J Pain* 26 Suppl 10:S10-S15.
67. Wang Z, Sadee W (2000). Tolerance to morphine at the mu-opioid receptor differentially induced by cAMP-dependent protein kinase activation and morphine. *Eur J Pharmacol* 389:165-171.
68. Wee S, Koob GF (2010). The role of the dynorphin-kappa opioid system in the reinforcing effects of drugs of abuse. *Psychopharmacology (Berl)* 210:121-135.
69. Wen HL, Ho WK (1982). Suppression of withdrawal symptoms by dynorphin in heroin addicts. *Eur J Pharmacol* 82:183-186.
70. Wen HL, Ho WK, Wen PY (1984). Comparison of the effectiveness of different opioid peptides in suppressing heroin withdrawal. *Eur J Pharmacol* 100:155-162.
71. Whistler JL, von Zastrow M (1998). Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9914-9919.
72. Woolf CJ, Wall PD (1982). Chronic peripheral nerve section diminishes the primary afferent A-fibre mediated inhibition of rat dorsal horn neurones. *Brain Res* 242:77-85.

73. Yaksh TL, Rudy TA (1976). Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. *Science* 192:1357-1358.
74. Yaksh TL, Rudy TA (1977). Studies on the direct spinal action of narcotics in the production of analgesia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 202:411-428.
75. Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, Chiba T (2002). Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. *Br J Pharmacol* 137:170-176.