

Joanna Starnowska-Sokół

Praca doktorska „*Efekty przeciwbólne nowych, dwufunkcyjnych związków hybrydowych w modelach bólu neuropatycznego*” wykonana w Zakładzie Farmakologii Bólu,

Instytut Farmakologii PAN

Promotor: prof. dr hab. n. med. Barbara Przewłocka

Kraków 2018

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Ból neuropatyczny definiowany jest przez Międzynarodowe Towarzystwo Badania Bólu jako: "ból spowodowany uszkodzeniem lub chorobą somatosensorycznego układu nerwowego". Mimo szerokiego spektrum dostępnych leków przeciwbólowych, leczenie tego rodzaju bólu wciąż pozostaje wyzwaniem dla współczesnej medycyny: ponad dwie trzecie pacjentów nie doświadcza satysfakcjonującego osłabienia objawów po żadnym z zastosowanych leków, co negatywnie wpływa na ogólne funkcjonowanie i jakość życia. Znalezienie nowego leku, skutecznego w terapii bólu neuropatycznego, jest więc bardzo ważnym zadaniem. Uszkodzenie nerwu, częsta przyczyna tego bólu, prowadzi do różnorodnych patologicznych procesów zachodzących w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym. W efekcie powstają nietypowe wrażenia czuciowe, w tym nadwrażliwość na bodźce neutralne i drażniące (odpowiednio: alodynia i hiperalgezia) jako najbardziej powszechne symptomy neuropatii. Ogółem, specyficzne mechanizmy leżące u podłoża bólu neuropatycznego odróżniają ten rodzaj bólu od fizjologicznej nocycypcji, co znajduje odzwierciedlenie również w obniżonej skuteczności typowych opioidowych leków przeciwbólowych w bólu neuropatycznym. Ów spadek efektywności może wynikać z zachodzących w warunkach uszkodzenia nerwu zmian funkcji endogennych systemów związanych z nocycypcją. Dlatego, jednoczesne modulowanie aktywności antynocycyptywnego systemu opioidowego oraz wybranego systemu związanego z nocycypcją powinno poprawić efektywność opioidów w bólu neuropatycznym.

Aby zweryfikować tę hipotezę, nowo zsyntezowane związki-hybrydy, w tym jedne zaprojektowane przez nas (OP-MC4) zostały przetestowane pod kątem działania analgetycznego w mysich i szczurzych modelach bólu nocycyptywnego i neuropatycznego. Każda hybryda zawierała dwa aktywne farmakofory (określane jako "związki macierzyste" jeśli występujące pod postacią osobnych cząsteczek): agonistę opioidowego (OP) oraz ligand wiążący się do wybranego receptora będącego częścią systemu związanego z nocycypcją. Do badań wybrano trzy takie receptory: nocycyptynowy (NOP), neurokininowy 1 (NK1) i melanokortynowy typu 4 (MC4). Receptor NOP cechuje wysoka homologia do receptorów opioidowych; określany bywa jako "czwarty typ" receptora opioidowego, a jego aktywacja może skutkować zarówno pro-, jak i przeciwbólowymi efektami. Receptor NK1 jest głównym receptorem dla pronocycyptywnego neuropeptydu, substancji P, która wywołuje anty-opioidowe efekty w układzie nerwowym. System receptora MC4 pozostaje w ścisłej relacji z systemem opioidowym, jako że główni endogeni agoniści receptorów MC4 i opioidowych powstają z tego samego prohormonu, proopiomelanokortyny (POMC).

W eksperymentach biochemicznych zbadano zmiany ekspresji mRNA i poziomu białka dla wybranych receptorów i ich ligandów w mysim modelu bólu neuropatycznego polegającym na odwracalnym jednostronnym uszkodzeniu nerwu kulszowego (model CCI) lub wywołaniu polineuropatii cukrzycowej podaniem streptozotocyny (model STZ). W badaniach behawioralnych na myszach i szczurach przetestowano 3 typy nowych związków-hybryd: OP-NOP (4 hybrydy), OP-NK1 (5 hybryd) i OP-MC4 (9 hybryd), wykorzystując testy mierzące analgezję (test odsuwania ogona, test von Freya, test zimnej płytki) oraz testy pozwalające zbadać ewentualne efekty niepożądane wynikające ze stosowania nowych związków: test pręta obrotowego, pasażu jelitowego, rozwoju tolerancji na efekt analgetyczny związków oraz tolerancję krzyżową z morfiną. Jako związki referencyjne wykorzystano tzw. związki macierzyste (aktywne farmakofory współtworzące strukturę hybryd w odrębnych cząsteczkach) oraz leki stosowane w praktyce klinicznej: morfinę i buprenorfinę. Obliczono też dawkę ED₅₀ w bólu nocyceptywnym i neuropatycznym. W badaniach wykazano, że hybrydy OP-NOP i OP-MC4 działały przeciwbólowo w bardzo niskich dawkach w modelach bólu neuropatycznego (najniższe ED₅₀ w teście von Freya: 0,0009 nmol dla hybrydy OP-NOP, 0,0002 nmol dla hybrydy OP-MC4), zapewniając długotrwały efekt przeciwbólowy (przynajmniej do 180 min. po podaniu nardzeniowym) bez wpływu na sprawność motoryczną myszy. Tolerancja na efekt analgetyczny (mierzony testem zimnej płytki) wybranych hybryd OP-NOP i OP-NK1, podawanych nardzeniowo raz dziennie, rozwinęła się później niż tolerancja na efekt analgetyczny morfiny. Co więcej, nie wystąpił efekt tolerancji krzyżowej po pojedynczym podaniu wybranej hybrydy OP-NOP lub OP-NK1 szczurom z rozwiniętą tolerancją na efekt analgetyczny morfiny w modelu CCI. Mimo że wszystkie wybrane hybrydy po podaniu dożylnym w modelu CCI wyraźnie spowolniły pasaż jelitowy myszy w stopniu porównywalnym do morfiny - znanej z efektów niepożądanych związanych z układem pokarmowym - to efekt przeciwbólowy tej samej dawki był znacznie silniejszy niż efekt morfiny.

Efekt analgetyczny po podaniu hybryd występuje w niższych dawkach niż związki zawierające tylko jeden efektywny farmakofor. Tolerancja na efekt analgetyczny hybryd z grupy OP-NOP i OP-NK1 rozwija się później niż tolerancja na efekt analgetyczny morfiny; co więcej, nie występuje zjawisko tolerancji krzyżowej po jednorazowym podaniu związku-hybrydy zwierzętom o rozwiniętej tolerancji na efekt analgetyczny morfiny, co sugeruje potencjalną przydatność tego typu związków w rotacji opioidów, którą stosuje się w terapii. Podsumowując, rezultaty prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej zawierają dowody na silne analgetyczne właściwości nowych hybryd, dwufunkcyjnych związków opioidu i dodatkowo wybranego liganda działającego na inny cel receptorowy, wzmacniającego działanie opioidu w bólu neuropatycznym. W efekcie tych badań, poza publikacjami wskazującymi na obiecującą drogę poszukiwania nowych leków przeciwbólowych do stosowania w bólu neuropatycznym, powstało zgłoszenie patentowe dla hybryd OP-MC4 pod kątem syntezy i działania tych związków w tym rodzaju bólu.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Neuropathic pain is defined by the International Association for the Study of Pain as: “pain caused by a lesion or disease of the somatosensory nervous system”. Despite of a wide variety of pharmacological treatments available, this type of pain still remains a challenge for today’s medicine: more than two third of patients treated experience insufficient pain relief, which negatively affects the overall functioning and quality of life. Finding a new, efficient drug to treat neuropathic pain is therefore of a great importance. Pathologic mechanisms underlying neuropathic pain symptoms are diversified and complex. A nerve damage, a common cause of neuropathic pain, leads to a variety of maladaptive processes in the peripheral and central nervous system. These complex phenomena manifest as various sensory abnormalities that can occur in different combinations, with oversensitivity to neutral and noxious stimuli (allodynia and hyperalgesia, respectively) being the most common symptoms of neuropathy. In general, distinctive neuropathic pain mechanisms make this type of pain differ utterly from the nociceptive (acute) pain, and this fact is reflected as well in the limited responsiveness of neuropathic pain symptoms to typical opioid analgesics. Their loss of function may be due to maladaptive change of functions of nociception-related endogenous systems that occur under nerve injury conditions. Therefore, a simultaneous action on the antinociceptive opioid system and a chosen nociception-related system should benefit in improved analgesic effectiveness of opioids in nerve injury-related pain.

To verify this hypothesis, novel hybrid compounds, including one type designed by us (OP-MC4) were synthesized and tested for their analgesic properties in acute and neuropathic pain models in mice and rats. Each hybrid compound contained two active pharmacophores (referred to as “parent compounds” when present in separate molecules): an opioid (OP) receptors agonist and a ligand binding to a chosen receptor being a part of a nociception-related system. In general, 3 such target receptors were chosen: nociceptin (NOP), neurokinin 1 (NK1) and melanocortin 4 (MC4) receptor. NOP receptor features a high homology to opioid receptors, being referred to as “the fourth type” of opioid receptor, and its activation can result in both pro- and antinociceptive effects. NK1 receptor is the main receptor for pronociceptive neuropeptide, substance P, that causes anti-opioid effects in the nervous system. Melanocortin 4 receptor system is closely related to opioid system, as the main endogenous agonists for MC4 and opioid receptors come from the same prohormone, proopiomelanocortin (POMC).

Biochemical experiments allowed to determine the changes of mRNA expression and protein levels of the chosen receptors and their main endogenous ligands in murine models of neuropathic pain - chronic constriction injury (CCI) and streptozotocin-induced diabetes polyneuropathy (STZ). In behavioural experiments on mice and rats 3 types of novel hybrid compounds were tested: OP-NOP (4 hybrids), OP-NK1 (5 hybrids) and OP-MC4 (9 hybrids). To measure analgesia, the following tests were used: tail-flick test, von Frey test, cold plate test. Additional tests, namely RotaRod test, gastrointestinal transit test, tolerance development test and cross-tolerance test, allowed to evaluate potential side effects of the

new compounds. Parent compounds were used as reference compounds, together with morphine and buprenorphine - on the basis of their clinical use. ED50 of the compounds was calculated for nociceptive and neuropathic pain models. Behavioral tests in mice and rats proved that OP-NOP and OP-MC4 hybrids were efficient in very low doses in neuropathic pain models neuropatycznego (the lowest ED50 in the von Frey test: 0.0009 nmol for OP-NOP hybrid, 0.0002 nmol for OP-MC4 hybrid), providing a long lasting effect (up to 180 min. after intrathecal injection in mice) without impairing the animals' motor performance. Chosen OP-NOP and OP-NK1 hybrids, when administered intrathecally once daily, provided a delayed tolerance to their analgesic effect, as measured in the cold plate test, when compared to morphine. What is more, no cross-tolerance effect occurred after a single injection of chosen OP-NOP and OP-NK1 hybrids to CCI-subjected rats tolerant to morphine. Although all chosen hybrids significantly hampered the gastrointestinal transit of CCI-subjected mice, comparably to morphine which is known for its gastrointestinal-related side effects, their analgesic effect in neuropathic pain was significantly stronger than the one provided by morphine after intravenous injection.

Hybrids provide analgesic effect in far lower doses than the single-pharmacophore compounds. The development of tolerance to the analgesic effect of the hybrids is delayed as compared to morphine; what is more, no cross-tolerance effect occurs, which suggests that hybrid compounds could be suitable for opioid therapy rotation used in the clinic. To sum up, the results presented in this thesis demonstrate the potent analgesic properties of novel bifunctional hybrid compounds that comprise opioid pharmacophore and additional ligand binding to another receptor target in order to boost the analgesic effect of the opioid. As a result of the studies presented, a few papers describing the promising strategy to find new neuropathic pain analgesics were published. The idea of new OP-MC4 hybrids synthesis was disclosed in patent application.