



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

mgr Łucja Kudła

Badanie działania nowych funkcjonalnie selektywnych agonistów receptorów opioidowych

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor: **prof. dr hab. Ryszard Przewłocki**

Kraków, 2022

PODZIĘKOWANIA

Serdeczne podziękowania składam przede wszystkim mojemu Promotorowi, prof. dr. hab. Ryszardowi Przewłockiemu. Dziękuję za wieloletnią opiekę merytoryczną oraz życzliwość i atmosferę sprzyjającą pracy i rozwojowi naukowemu.

Dziękuję Współpracownikom z Zakładu Chemii Leków, prof. dr. hab. Andrzejowi Bojarskiemu, dr. Sabinie Podlewskiej i dr. Grzegorzowi Satale. Szczególne podziękowania kieruję do dr. Ryszarda Bugno, który przeprowadził syntezę agonistów badanych w niniejszej rozprawie oraz zawsze służył mi pomocą w przygotowaniu związków do badań.

Prof. dr. hab. Barbarze Przewłockiej dziękuję za wsparcie metodologiczne przy nardzeniowych podaniach substancji, a także za cenne wskazówki dotyczące treści niniejszej rozprawy.

Prof. dr. hab. Krystynie Gołębiewskiej i dr. hab. Wojciechowi Soleckiemu dziękuję za współpracę przy wybranych doświadczeniach, które weszły w skład naszej wspólnej publikacji oraz rozprawy doktorskiej.

Dziękuję też wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Neurofarmakologii Molekularnej za życzliwość i każdą udzieloną mi pomoc. Uli dziękuję za nauczanie mnie praktycznej pracy w laboratorium, Łucji - za pomoc w doświadczeniach behawioralnych, a Lidce - za nieocenione wsparcie, nie tylko administracyjne.

Łukaszowi dziękuję za pomoc eksperymentalną, ale przede wszystkim za codzienną wyrozumiałość, motywację i dzielenie radości z każdego sukcesu.

Badania zawarte w niniejszej rozprawie doktorskiej finansowane były ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych w grantach naukowych OPUS 16 (2018/31/B/NZ7/03954) i PRELUDIUM 17 (2019/33/N/NZ7/02378).

Narodowemu Centrum Nauki dziękuję także za wsparcie finansowe w postaci stypendium doktorskiego ETIUDA 8 (2020/36/T/NZ7/00476).

Streszczenie

Opioidy są silnymi środkami przeciwbólowymi, często stosowanymi w medycynie. Posiadają także działanie psychoaktywne, przez co zażywane bywają rekreacyjnie. Popularne opioidy, takie jak morfina, fentanyl czy oksykodon, wywierają efekt biologiczny poprzez aktywację receptorów opioidowych μ . Terapeutyczny potencjał opioidów jest szeroki, jednak ich kliniczną użyteczność poważnie ograniczają działania niepożądane – potencjalnie śmiertelna depresja oddechowa, zaparcia oraz ryzyko rozwoju uzależnienia. Szczególnie istotne jest zatem opracowanie nowych leków opioidowych o bezpieczniejszym profilu działania i słabszym potencjale uzależniającym.

Działanie agonisty na receptor opioidowy μ prowadzi do aktywacji dwóch wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych, zależnych odpowiednio od białka G oraz β -arestyny-2. Badania, w których wykorzystano myszy transgeniczne pozbawione genu kodującego β -arestynę-2 wykazały, że podanie morfiny u tych zwierząt wiąże się z nasileniem i przedłużeniem antynocycypcji oraz osłabieniem niektórych działań niepożądanych. Interesującym podejściem do projektowania nowych agonistów receptora μ stała się więc synteza związków cechujących się tzw. selektywnością funkcjonalną (stronniczym agonizmem; ang. *functional selectivity/biased agonism*), która umożliwia preferencyjną aktywację wybranej ścieżki sygnałowej. Agoniści receptora opioidowego μ , działający przez szlak zależny od białka G i minimalnie angażujący β -arestynę-2, zostali zaproponowani jako potencjalnie bezpieczniejsza i słabiej uzależniająca alternatywa dla klasycznych agonistów tego receptora. Do tej pory odkryto kilka związków o takim profilu działania, a jeden z nich, TRV130 (olicerydyna), został dopuszczony do użytku medycznego w Stanach Zjednoczonych.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie działania nowych funkcjonalnie selektywnych agonistów receptora opioidowego μ . Wykorzystano związki o wysokim współczynniku selektywności wobec ścieżki sygnałowej zależnej od białka G – PZM21, SR-14968 oraz SR-17018. Przy zastosowaniu testów

Streszczenie

behawioralnych uzupełnionych badaniami biochemicznymi, poddano ocenie efekty działania tych agonistów ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjału uzależniającego u gryzoni laboratoryjnych.

Wykazano, że wszystkie związki mają zależne od dawki i długotrwałe działanie antynocyceptywne. W odróżnieniu od SR-14968 i SR-17018, PZM21 nie wywoływał maksymalnej odpowiedzi antynocyceptywnej. Następnie zbadano wpływ agonistów na różne symptomy związane z uzależnieniem opioidowym. Wielokrotne podania badanych związków prowadziły do rozwoju tolerancji na działanie antynocyceptywne, jednak w przypadku związków SR rozwijała się ona wolniej. Związki wywoływały też zależność fizyczną i zespół odstawienia. U zwierząt otrzymujących PZM21 objawy odstawienia występowały jedynie w grupie chronicznie otrzymującej najwyższą testowaną dawkę agonisty, natomiast związki SR-14968 i SR-17018 powodowały zależność fizyczną nawet w niskich dawkach. Ponadto badani agoniści różnie wpływali na aktywność lokomotoryczną zwierząt. PZM21 i SR-17018 nie zmieniały w znaczącym stopniu aktywności myszy, natomiast SR-14968 wpływał na nasilenie lokomocji po jednorazowym podaniu, tolerancję na ten efekt w przebiegu podań wielokrotnych i znaczne nasilenie aktywności po okresie inkubacji. W modelu warunkowanej preferencji miejsca wykazano nagradzające właściwości SR-14968 oraz SR-17018. PZM21 nie miał efektów nagradzających w tym teście, a w zakresie badanych dawek nie był także dożylnie samopodawany przez szczury i nie wywoływał poszukiwania substancji w okresie abstynencji. W tej części badań wykazano zatem, że badani agoniści w zróżnicowany sposób wpływają na wybrane zachowania związane z uzależnieniem.

W kolejnym etapie badań ocenie poddano wpływ PZM21, SR-14968 i SR-17018 na behawioralną odpowiedź na morfinę. Wykazano, że badani agoniści nasilają antynocyceptywne działanie morfiny, a SR-14968 oraz SR-17018 dodatkowo nieznacznie opóźniają rozwój tolerancji morfinowej. Badane związki osłabiały też niektóre objawy zespołu odstawienia u myszy uzależnionych od morfiny, a PZM21 znosił nagradzające efekty tego opioidu w teście warunkowanej preferencji miejsca.

Z uwagi na interesujący profil działania PZM21 (brak efektów nagradzających/wzmacniających i słaby potencjał do wywoływania zależności fizycznej), przeprowadzono także dodatkowe doświadczenia, których celem było

Streszczenie

zbadanie efektów tego związku w różnych paradygmatach behawioralnych związanych z działaniem stresu. Pomimo że istnieją przesłanki wskazujące na protekcyjne działanie agonistów receptora μ w warunkach stresowych, w badaniach własnych nie wykazano pozytywnego wpływu PZM21 na bezpośrednią odpowiedź na stres ani pamięć związaną z traumą w modelu warunkowania strachem. Związek nie zmieniał ponadto funkcjonowania poznawczego zwierząt w warunkach neutralnych. W badanym zakresie PZM21 nie miał zatem istotnego wpływu na fenotyp myszy.

Podsumowując, w ramach badań własnych przeprowadzono szeroką charakterystykę nowych agonistów receptora opioidowego μ o wysokim stopniu selektywności funkcjonalnej wobec szlaku sygnałowego zależnego od białka G. Rezultaty wskazały na istotne różnice w działaniu badanych agonistów, co świadczy o tym, że opioidy selektywne funkcjonalnie stanowią heterogenną grupę substancji. Najważniejsze różnice między badanymi agonistami przejawiają się w tym, że związki SR-14968 i SR-17018 wywołują silniejsze działanie antynocyceptywne niż PZM21. Z kolei jako jedyny z badanych związków, PZM21 nie działa nagradzająco i nie powoduje silnej zależności fizycznej. Potencjał terapeutyczny badanych agonistów może być także rozszerzony o kontrolę wybranych aspektów uzależnienia od konwencjonalnych opioidów, tj. łagodzenia niektórych symptomów odstawienia od morfiny, a w przypadku PZM21 także osłabiania jej nagradzających właściwości. Dzięki tym efektom badane związki mogą znaleźć zastosowanie w farmakoterapii zaburzeń związanych z używaniem opioidów.

Abstract

Opioids are powerful painkillers, commonly used in medicine. Those drugs also possess psychoactive effects, contributing to their recreational use. Popular opioids, such as morphine, fentanyl or oxycodone, exert a biological effect by the activation of the μ -opioid receptors. The therapeutic potential of opioids is wide, but their clinical utility is severely limited by side effects - potentially fatal respiratory depression, constipation and the risk of addiction development. Therefore, substantial efforts aimed at developing new opioid drugs with a safer action profile and a lower addiction potential are particularly important.

An agonist binding to the μ -opioid receptor results in the activation of two intracellular signaling pathways, G protein- and β -arrestin-2-dependent, respectively. Studies in transgenic mice lacking the gene encoding β -arrestin-2 have shown that morphine administration in these animals is associated with potentiation and prolongation of antinociception as well as with the reduction of some side effects. The aim of designing new μ -opioid receptor agonists has therefore become the synthesis of compounds characterized by the functional selectivity/biased agonism, which enables the preferential activation of a selected cell signaling pathway. μ -opioid receptor agonists, activating the G protein-dependent pathway and minimally involving β -arrestin-2, have been proposed as a potentially safer and less addictive alternative to conventional agonists of this receptor. To date, several compounds presenting such profile of action have been discovered, and one of them, TRV130 (oliceridine), has been approved for medical use in the United States.

This dissertation aimed to investigate the effects of novel functionally selective μ -opioid receptor agonists. The compounds with high G protein bias factors - PZM21, SR-14968 and SR-17018 – were used. Using a battery of behavioral tests supplemented with biochemical studies, the effects of these agonists were assessed, with particular emphasis on their addictive potential in laboratory rodents.

All the compounds induced dose-dependent and long-lasting antinociception. Unlike SR-14968 and SR-17018, PZM21 did not elicit a maximal antinociceptive

Abstract

response. The effects of the tested agonists on various aspects of opioid-related addictive behavior were then investigated. Repeated administration of the tested compounds led to antinociceptive tolerance, but in the case of SR-14968 and SR-17018, the development of tolerance was slightly delayed. The tested agonists also induced physical dependence, as measured by the severity of withdrawal symptoms. In mice treated with PZM21, this effect occurred at the highest dose evaluated, while SR-14968 and SR-17018 caused physical dependence even at low doses. The compounds differed in terms of their influence on locomotor activity. PZM21 and SR-17018 did not significantly change the activity of animals, while SR-14968-treated mice presented enhanced locomotor activity after a single drug administration, followed by tolerance to this effect during repeated treatment and high expression of activity after the incubation period. The rewarding properties of 14968 and SR-17018 have been demonstrated in the conditioned place preference test. PZM21 was not rewarding in this paradigm. Moreover, at the tested doses, it was not self-administered intravenously by rats and did not induce drug-seeking behavior during the abstinence. Therefore, in this part of the study, it was shown that the tested agonists differently influence the selected types of addiction-related behaviors.

In the next stage of the research, the influence of PZM21, SR-14968 and SR-17018 on the behavioral response to morphine was assessed. The tested agonists intensified morphine-induced antinociception. Additionally, SR-14968 and SR-17018 slightly delayed the development of morphine antinociceptive tolerance. Interestingly, the compounds attenuated some symptoms of the withdrawal syndrome in mice physically dependent on morphine. Moreover, PZM21 abolished the rewarding effects of morphine in the conditioned place preference test.

As PZM21 had an interesting profile of action (lack of rewarding/reinforcing effects and low physical dependence), additional experiments aimed to assess its effects in various stress-related behavioral paradigms were performed. Even though there is evidence showing protective effects of μ receptor agonists under stress conditions, there were no effects of PZM21 on acute response to stress or trauma-related memory in the fear conditioning model. This compound did not also affect cognitive functioning under neutral conditions. Therefore, in the studied area of behaviors, PZM21 had no considerable influence on the phenotype of mice.

Abstract

In conclusion, this doctoral dissertation has provided a wide characterization of selected μ -opioid receptor agonists, reported to present a high G protein bias. The obtained data indicate that such compounds are a heterogenous group with varying effects. The most crucial differences between the tested agonists are that SR-4968 and SR-17018 induce stronger antinociception than PZM21. On the other hand, unlike SR agonists, PZM21 is not rewarding and does not cause profound physical dependence. The therapeutic potential of the tested agonists can also be extended to control selected aspects of opioid addiction, i.e. alleviating some morphine withdrawal symptoms, and, in the case of PZM21, weakening its rewarding properties. Due to this, the tested agonists may be potentially used in the pharmacotherapy of opioid use disorder.

Spis treści

Streszczenie	1
Abstract.....	5
Spis treści	9
Wstęp	13
1. Opioidy – mechanizmy i efekty działania.....	13
Perspektywa historyczna.....	13
Receptory opioidowe i ich ligandy	15
Molekularne i komórkowe mechanizmy związane z aktywacją receptora μ	18
Fizjologiczne i behawioralne efekty aktywacji receptora μ	20
Uzależnienie od opioidów	25
2. Selektyność funkcjonalna ligandów receptorów opioidowych.....	29
Selektyność funkcjonalna ligandów receptorów związanych z białkiem G.....	29
Badania nad rolą β -arestyny-2 w powstawaniu niepożądaných działań agonistów receptorów opioidowych	31
Przegląd efektów działania selektywných funkcjonalnie opioidów w badaniach podstawowych i klinicznych.....	33
Cel badań	39
Materiały i metody.....	41
1. Zwierzęta	41
2. Badane substancje	44
3. Procedury operacyjne	45
Implantacja kateterów do podań nardzeniowych	45
Implantacja kateterów do dożylnego samopodawania substancji	45
Implantacja kaniul dializacyjnych do mikrodializy mózgu.....	46
4. Pomiar wrażliwości nocyceptywnej.....	46
Test odsuwania ogona	46
Test gorącej płytki	47
5. Ocena zachowań związanych z uzależnieniem	47
Tolerancja	47
Zależność fizyczna (odstawienie precypitowane naloksonem)	48

Spis treści

Aktywność lokomotoryczna po jednorazowych i wielokrotnych podaniach substancji.....	49
Warunkowana preferencja miejsca.....	49
Dożylne samopodawanie substancji.....	50
Reakcja Strauba.....	51
6. Pomiar bezpośredniej odpowiedzi na stres, lękowości oraz pamięci związanej ze strachem.....	52
Test wymuszonego pływania.....	52
Test zawieszenia za ogon.....	52
Test jasnego/ciemnego pudełka.....	53
Warunkowanie strachem.....	53
7. Ocena zdolności poznawczych.....	53
Labirynt w kształcie litery Y.....	53
Test rozpoznawania nowego obiektu.....	54
8. Pomiar zewnątrzkomórkowego poziomu monoamin w prążkowie.....	55
9. Badanie powinowactwa do receptorów opioidowych.....	56
10. Pomiar aktywacji białka G (wiązanie [³⁵ S]GTPγS).....	57
11. Analiza danych.....	58
Wyniki.....	59
1. Antynocyceptywne efekty PZM21, SR-14968 oraz SR-17018.....	59
PZM21.....	59
SR-14968.....	63
SR-17018.....	65
2. Potencjał uzależniający PZM21, SR-14968 i SR-17018.....	68
PZM21.....	68
SR-14968 i SR-17018.....	75
3. Modulacja behawioralnych efektów morfiny przez PZM21, SR-14968 i SR-17018.....	81
PZM21.....	81
SR-14968 i SR-17018.....	84
4. Wpływ PZM21 na odpowiedź na stres.....	87
5. Dane uzupełniające.....	92
Wpływ PZM21 na zdolności poznawcze.....	92
Uwalnianie monoamin z prążkowie po jednorazowym podaniu PZM21.....	94
Powinowactwo PZM21, SR-14968 i SR-17018 do receptorów opioidowych.....	96
Aktywacja białka G wywołana przez PZM21.....	96
Reakcja Strauba.....	97

Spis treści

6. Zestawienie uzyskanych wyników	99
Dyskusja.....	101
1. Antynocyceptywne działanie funkcjonalnie selektywnych agonistów receptora opioidowego μ	101
2. Wpływ badanych agonistów na zachowania związane z uzależnieniem	104
Tolerancja na działanie antynocyceptywne	105
Zależność fizyczna i zespół odstawienia	108
Aktywność lokomotoryczna po jednorazowych i wielokrotnych podaniach	110
Efekty nagradzające	111
Efekty wzmacniające i zachowania związane z poszukiwaniem substancji w okresie abstynencji.....	114
3. Wpływ PZM21, SR-14968 i SR-17018 na behawioralne efekty morfiny.....	116
4. Wpływ PZM21 na efekty stresu	119
5. Analiza działania funkcjonalnie selektywnych agonistów receptora μ w kontekście nowych danych dotyczących roli β -arestyny-2 w niepożądanych działaniach opioidów.....	122
6. Wpływ idei selektywności funkcjonalnej na opracowywanie nowych leków opioidowych.....	125
Podsumowanie i wnioski.....	129
Literatura	131
Spis tabel	147
Spis rycin	149
Wykaz wybranych skrótów.....	153

Wstęp

Opioidy stanowią wartościową grupę leków, ponieważ wyróżniają się wysoką skutecznością przeciwbólową. Są często stosowane w praktyce klinicznej, lecz z uwagi na efekty psychoaktywne bywają również używane w celach rekreacyjnych. Terapeutyczna użyteczność opioidów jest poważnie ograniczona z powodu działań niepożądanych, w tym także silnego potencjału uzależniającego.

Celem rozdziału jest przedstawienie najważniejszych kwestii teoretycznych związanych z mechanizmami oraz efektami działania opioidów, a także opis farmakologicznego zjawiska selektywności funkcjonalnej, na podstawie którego opracowano agonistów będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej.

1. Opioidy – mechanizmy i efekty działania

Od czasu odkrycia receptorów opioidowych i ich endogennych ligandów ustalono, że opioidy wywierają efekty, naśladując działanie trzech rodzin endogennych peptydów opioidowych. Układ opioidowy bierze udział w szeregu ważnych procesów fizjologicznych, a także jest zaangażowany w procesy poznawcze i emocjonalne. Związki o agonistycznym działaniu na receptory opioidowe do dziś pozostają najczęściej stosowanymi lekami przeciwbólowymi w medycynie, chociaż wywołują wiele działań niepożądanych i mogą skutkować rozwojem uzależnienia. W tej części wstępu dokonano przeglądu aktualnej wiedzy na temat roli opioidów i układu opioidowego w kontroli procesów fizjologicznych i psychicznych oraz molekularnych mechanizmów ich działania.

Perspektywa historyczna

Starożytne społeczeństwa zbudowały załączki współczesnej farmakoterapii wykorzystując dobroczynne działanie przeróżnych roślin, w tym także maku lekarskiego (łac. *papaver somniferum*), z którego pochodzi opium. Pierwsze wzmianki o jego stosowaniu odnaleźć można już w pismach autorstwa greckiego filozofa Teofrasta z Eresos, datowanych na II wiek p.n.e. (za: Yaksh i Wallace, 2017). Notatki

Wstęp

o opium znajdują się w najważniejszych starożytnych tekstach medycznych autorstwa Galena i Awicenny (za: Duarte, 2005). Opium używano nie tylko w Grecji, gdyż jego korzystne działanie wykorzystywane było przez wszystkie najważniejsze cywilizacje starożytnego świata – egipską, indyjską, perską, sumeryjską, asyryjską, rzymską i arabską (Schiff, 2007). Głównym wskazaniem do jego stosowania były efekty przeciwbólowe, dzięki czemu starożytni mogli przeprowadzać długotrwałe zabiegi chirurgiczne. Z czasem społeczeństwa odkryły inne wskazania dla wykorzystania opium, a więc działanie uspokajające i nasenne. Arabowie używali go także w leczeniu czerwonki, czyli ostrej zakaźnej choroby jelit (Booth, 2013). Do czasów nowożytnych, stosowanie opium było powszechne, chociaż często ograniczane z powodów religijnych i politycznych. Opium wchodziło w skład teriaku, czyli wieloskładnikowej mikstury, która aż do XIX wieku stosowana była jako wszechstronna odtrutka, panaceum (Hodgson, 2001).

W XIX wieku opiaty były szczególnie popularne w Europie, a także w Stanach Zjednoczonych, gdzie rutynowo używano ich podczas wojny secesyjnej. Co ciekawe, wtedy też na szerszą skalę odnotowano ich uzależniające właściwości. Ukuto nawet pojęcie „choroby żołnierskiej”, na którą cierpieli żołnierze, którzy podczas wojny uzależnili się od opiatów (Kamieński, 2011). W podobnym czasie, próby ograniczenia transportu brytyjskiego opium do Chin doprowadziły do wybuchu tzw. wojen opiumowych, co jest wyraźnym przykładem na to, że dość uniwersalne zastosowania tego narkotyku i nielegalna dystrybucja, świadczą nie tylko o jego dużym znaczeniu medycznym, ale mogą stanowić podłoże ważnych wydarzeń społecznych (Feige i Miron, 2008). Wiek XIX to też skokowy postęp w rozwoju wiedzy o opiatkach, a kluczowym wydarzeniem w tym kontekście było wyizolowanie z opium morfiny, które miało miejsce w 1804 roku za sprawą niemieckiego farmaceuty - Friedricha Sertürnera. Jedną z najważniejszych właściwości nowej substancji było działanie nasenne, więc na cześć greckiego boga snu, Morfeusza, nazwano ją morfiną (Krishnamurti i Rao, 2016). Wydarzenie to otworzyło drogę do późniejszych modyfikacji jej struktury chemicznej i powstawania związków pochodnych. W drugiej połowie XIX wieku morfinę stosowano w procedurach chirurgicznych oraz do uśmierzania bólu pooperacyjnego i przewlekłego. Szybko okazało się jednak, że podobnie jak opium, morfina silnie uzależnia, a w pewnych warunkach jej stosowanie może być niebezpieczne. Rozpoczęto więc wkładać wysiłki w modyfikację jej

struktury, aby stworzyć związek działający podobnie, lecz pozbawiony działań niepożądanych. W 1898 roku zsyntetyzowano heroinę i ogłoszono, że charakteryzuje się ona silniejszym działaniem i brakiem potencjału uzależniającego. Do tej pory podobny schemat wielokrotnie miał miejsce podczas odkrywania kolejnych związków opioidowych. Niestety, początkowa ekscytacja nie znajdowała potwierdzenia w toku kolejnych badań i stosowania owych związków w farmakoterapii.

W pierwszej połowie XX wieku rozwój tej dziedziny farmakologii ukierunkowano na poszukiwania związków o właściwościach podobnych do morfiny, lecz strukturalnie z nią niezwiązanych. W ten sposób odkryto petydynę i metadon (Eisleb i Schaumann, 1939; Scott i Chen, 1946; za: Brownstein, 1993). Na tym etapie szczególnie doceniono właściwość metadonu, jaką jest dłuższe i mniej euforyczne działanie, co znalazło zastosowanie w terapii substytucyjnej w leczeniu odwykowym (Sim, 1973). W tym okresie odkryty został też pierwszy antagonist opioidowy – nalorfina (Weijlard i Erikson, 1942; za: Brownstein, 1993). W kolejnych latach nastąpił szybki rozwój wiedzy o farmakologii opioidów, a zróżnicowane działanie różnych substancji (agonistów, antagonistów i agonistów-antagonistów) powiązano z nieznanym jeszcze wówczas zróżnicowaniem receptorów, przez które te substancje wywołują efekty biologiczne. W toku rozwoju wiedzy i kolejnych doświadczeń ustalono, że istnieją endogenne substancje, które działają na receptory opioidowe. Podzielono je na trzy główne typy (początkowo wyróżniano jeszcze receptor σ , którego obecnie nie uznaje się za receptor opioidowy). Kolejne dekady to skokowy wzrost odkryć w obszarze farmakologii opioidów. Syntetyzowano i testowano kolejne ligandy o zróżnicowanych właściwościach farmakologicznych. Wraz z odkrywaniem terapeutycznego potencjału związków w różnych wskazaniach, pogłębiono także wiedzę o niepożądanych działaniach tych substancji. Poszukiwanie nowych ligandów o osłabionych skutkach ubocznych stało się w efekcie wspólnym dążeniem badaczy reprezentujących różne dziedziny nauki.

Receptory opioidowe i ich ligandy

Zarówno ligandy endogenne, jak i egzogenne substancje opioidowe, wywołują efekty farmakologiczne przez receptory opioidowe zlokalizowane w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym oraz w tkankach budujących inne

układy. Nazewnictwo substancji działających na układ opioidowy obejmuje dwa podstawowe określenia: opiaty oraz opioidy. Opiaty są to związki strukturalnie związane z opium, ekstraktem otrzymywanym poprzez wysuszenie soku mlecznego z niedojrzałych makówek maku lekarskiego (nazwa pochodzi od greckiego słowa oznaczającego sok). Natomiast opioidami określamy wszystkie związki, które posiadają funkcjonalne i farmakologiczne właściwości opiatów, niezależnie od ich pochodzenia i struktury chemicznej (Yaksh i Wallace, 2017).

Wśród receptorów opioidowych wyróżniamy trzy główne typy: μ , δ i κ . Za czwarty typ receptora opioidowego uważa się często receptor nocycetynowy (ang. *opioid receptor-like 1, ORL-1*). Cechuje się on wysokim podobieństwem do receptorów opioidowych, a jego endogennym ligandem jest nocycetyna mająca, w zależności od miejsca podania, działanie pro- lub antynocycetywne (Kotlińska i Rafalski, 2004). Scharakteryzowano trzy główne rodziny peptydów opioidowych – endorfiny, enkefaliny i dynorfiny, które powstają z prekursorowych polipeptydów – proopiomelanokortyny, proenkefaliny i prodynorfiny (Al-Qattan i in., 2020). Zidentyfikowano także dwa inne krótkie peptydy, które wykazują wysokie powinowactwo i selektywność do receptorów opioidowych μ . Te peptydy - endomorfina-1 i endomorfina-2 - powodują silne i długotrwałe działanie przeciwbólowe u zwierząt, jednak ich funkcje wciąż nie są dokładnie poznane (Horvath, 2000). Enkefaliny preferencyjnie oddziałują z receptorem δ , dynorfiny z receptorem κ , a β -endorfiny wiążą się z porównywalnym powinowactwem z receptorami μ i δ . Należy mieć jednak na uwadze, że endogenne peptydy, chociaż wiążą się z większym powinowactwem do określonego typu receptora, oddziałują także z pozostałymi receptorami opioidowymi (Fricker i in., 2020). Podstawowe informacje o receptorach opioidowych, ich endogennych ligandach i efektach pobudzenia przedstawia **Tabela 1**.

Tabela 1. Receptory opioidowe – podstawowe informacje.

Typ receptora	Endogeny ligand i białko prekursorowe	Efekty pobudzenia receptora
μ	β -endorfiny powstające z proopiomelanokortyny, endomorfiny (1 i 2; białka prekursorowe dotąd niepoznane)	- antynocycpcja/analgezia, - depresja ośrodka oddechowego, - zwężenie źrenic, - hamowanie perystaltyki jelit, - zależność fizyczna, - euforia;
δ	enkefaliny powstające z proenkefaliny, β -endorfiny powstające z proopiomelanokortyny;	- antynocycpcja/analgezia, - zależność fizyczna, - euforia, - działanie drgawkowe, - działanie przeciwdepresyjne;
κ	dynorfiny powstające z prodynorfiny	- antynocycpcja/analgezia na poziomie rdzenia kręgowego, - zwężenie źrenic, - zahamowanie wydzielania hormonu antydiuretycznego, - efekty przeciwdrgawkowe, - sedacja, - awersja, - działanie depresyjne;
ORL-1	nocyceptyna powstająca z pronocyceptyny	- hiperalgezia po podaniu dokomorowym, - analgezia po podaniu nardzeniowym, - działanie anksjolityczne, - osłabianie uzależnień lekowych;

Opracowanie własne na podstawie prac: Fricker i in. (2020), Emery i Akil (2020) oraz Kotlińska i Rafalski (2005).

Receptory opioidowe mogą być aktywowane przez endogenne peptydy opioidowe, ale aktywność receptorów może być także kontrolowana poprzez egzogenne substancje (selektywnych i nieselektywnych agonistów i antagonistów), co otworzyło ścieżkę do zastosowania substancji farmakologicznych działających przez układ opioidowy w farmakoterapii zaburzeń psychicznych i chorób somatycznych, ale też używania tych substancji w sposób rekreacyjny. Istnieją zarówno substancje pochodzenia naturalnego, jak i syntetyczne, które zdolne są do farmakologicznej aktywacji bądź blokowania receptorów opioidowych.

Eksperymentalna część rozprawy dotyczy agonistów receptora opioidowego μ , dlatego też w kolejnych podrozdziałach omówione zostaną efekty związane z aktywacją tego receptora.

Molekularne i komórkowe mechanizmy związane z aktywacją receptora μ

Receptory opioidowe należą do grupy receptorów związanych z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptors, GPCR*). Są to receptory zbudowane z pojedynczego polipeptydu mającego strukturę α -helikalną. Receptor zanurzony jest w błonie komórkowej, przez którą siedmiokrotnie przechodzi łańcuch polipeptydowy. Receptory te są dlatego nazywane siedmiohelikalnymi transmembranowymi receptorami komórkowymi (ang. *seven-(pass)-transmembrane domain receptors, 7TM receptors*). Koniec karboksylowy (koniec C) receptora znajduje się wewnątrz, natomiast koniec aminowy (koniec N) na zewnątrz komórki. Przyłączenie liganda zmienia konformację wewnątrzkomórkowej części receptora, prowadząc do aktywacji białka G (Blumenthal i Garrison, 2015).

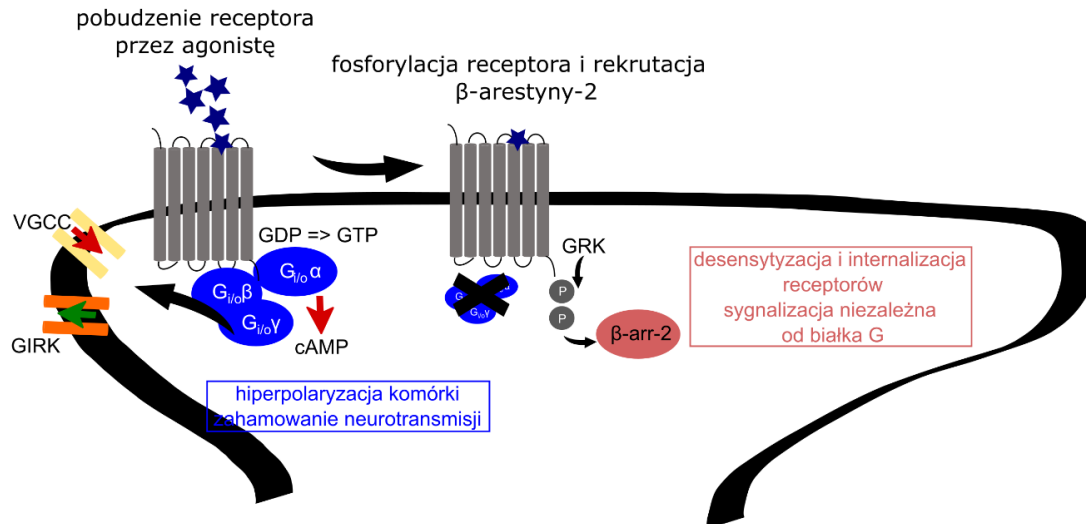
Pobudzenie receptorów opioidowych prowadzi do zahamowania czynności komórek, co na poziomie fizjologicznym objawia się zniesieniem odczuwania bólu. Przyłączenie się cząsteczki sygnałowej do receptorów opioidowych μ , δ lub κ prowadzi do aktywacji białka $G_{i/o}$ znajdującego się po wewnętrznej stronie błony komórkowej. Rezultatem tej aktywacji jest szereg zdarzeń wewnątrzkomórkowych wpływających na aktywność neuronalną oraz transkrypcję genów. Białko G jest heterotrimerem, a więc zbudowane jest z trzech podjednostek: α , β i γ . Przyłączenie liganda prowadzi do zmiany konformacji części wewnętrznej receptora, do której przyłącza się podjednostka α , co z kolei wywołuje aktywację białka G. Następnie dochodzi do wymiany GDP na GTP i odłączenia się podjednostki $G_{i/o}\alpha$ od heterodimeru $G_{i/o}\beta\gamma$. Obie części zdysocjowanego białka G aktywują specyficzne białka efektorowe (Denis i in., 2012).

Podjednostka $G_{i/o}\alpha$ hamuje aktywność cykazy adenylowej, co w efekcie prowadzi do spadku produkcji cyklicznego adenozylo-3',5'-monofosforanu (cAMP). Obniżone stężenie cAMP moduluje aktywność błonowych kanałów jonowych (Al-Qattan i in., 2020) oraz wpływa na osłabienie aktywności efektorowych kinaz białkowych, jak na przykład kinazy białkowej A (ang. *protein kinase A, PKA*). Spadek

produkcji cAMP jest markerem ostrej stymulacji receptorów opioidowych, jednak w przebiegu chronicznej ekspozycji na opioidy dochodzi do „upregulacji” cAMP, co jest z kolei molekularnym markerem adaptacji neuronalnych odpowiadających za zależność fizyczną od opioidów i tolerancję (Chan i Lutfy, 2016). Z kolei podjednostka $G_{i/o}\beta\gamma$ bezpośrednio oddziałuje z kanałami jonowymi znajdującymi się w błonie komórkowej – aktywuje kanały potasowe typu GIRK (ang. *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels, GIRK*), prowadząc do hiperpolaryzacji komórek nerwowych i hamowania ich aktywności oraz blokuje bramkowane napięciem kanały wapniowe (ang. *voltage-gated calcium channels, VGCC*), co wpływa na hamowanie uwalniania neuroprzekazników (Al-Hasani i Bruchas, 2011; Nestler, 1996).

Poza interakcją z białkiem G stymulacja receptorów opioidowych prowadzi także do aktywacji innych białek, które pełnią w komórkach funkcje regulatorowe. W efekcie ich działania dochodzi do desensytyzacji (odczulania) oraz internalizacji receptorów. Fosforylacja receptora przez specyficzne kinazy białek GPCR (ang. *G protein-coupled receptor kinases, GRK*) prowadzi do przyłączenia się β -arestyny-2 (β -arr2), która pośredniczy w procesach związanych z desensytyzacją i internalizacją receptorów. Ponadto, β -arr2 „przełącza” przekazywanie sygnału w kierunku innych, niezależnych od białka G, ścieżek sygnałowych, takich jak np. zależne od MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases, MAPK*). Najliczniejszymi członkami rodziny MAPK w neuronach są zewnątrzkomórkowe kinazy regulowane sygnałem ERK1/ERK2 (ang. *extracellular signal-regulated kinases, ERK*). Aktywacja ścieżki MAPK/ERK prowadzi z kolei do aktywacji czynnika transkrypcyjnego CREB (ang. *cyclic AMP-responsive element binding, CREB*), który reguluje ekspresję wybranych genów (Bilecki i Przewłocki, 2000). Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, rola białek G i β -arr2 w aktywacji ERK pozostaje kontrowersyjna. Najnowsze dane wskazują, że aktywacja tego szlaku wymaga zarówno zaangażowania białek G i β -arr2 (Smith i in., 2021). Wydaje się więc, że sygnalizacja wynikająca z działania agonisty na receptor opioidowy może angażować zarówno ścieżki związane z aktywacją białka G, β -arr2, jak i pewne szlaki wymagające aktywności kompleksu białko G: β -arr2 (Che i in., 2021). Uproszczony schemat działania agonisty na receptor opioidowy μ przedstawiono na **Rycinie 1**.

Wstęp



Rycina 1. Sygnalizacja wewnątrzkomórkowa i jej regulacja na przykładzie receptora opioidowego μ .

Przyłączenie do receptora agonisty prowadzi do aktywacji białka G_{i/o}, które w wyniku wymiany GDP na GTP dysocjuje na podjednostkę G_{i/o}α i heterodimer G_{i/o}βγ. Podjednostka G_{i/o}α hamuje aktywność cykazy adenylowej prowadząc do spadku stężenia cAMP, natomiast podjednostka G_{i/o}βγ wpływa na aktywność kanałów jonowych – aktywuje kanały potasowe typu GIRK i blokuje kanały wapniowe (VGCC). W efekcie dochodzi do hiperpolaryzacji błony komórkowej, zahamowania aktywności neuronalnej i blokady uwalniania neurotransmiterów. Następnie receptor jest fosforylowany przez kinazę GRK, co prowadzi do rekrutacji β-arr2, która z kolei bierze udział w desensytyzacji i internalizacji receptora oraz aktywacji szlaków sygnałowych niezależnych od białka G.

Opracowanie własne na podstawie Al-Hasani i Bruchas (2011).

Fizjologiczne i behawioralne efekty aktywacji receptora μ

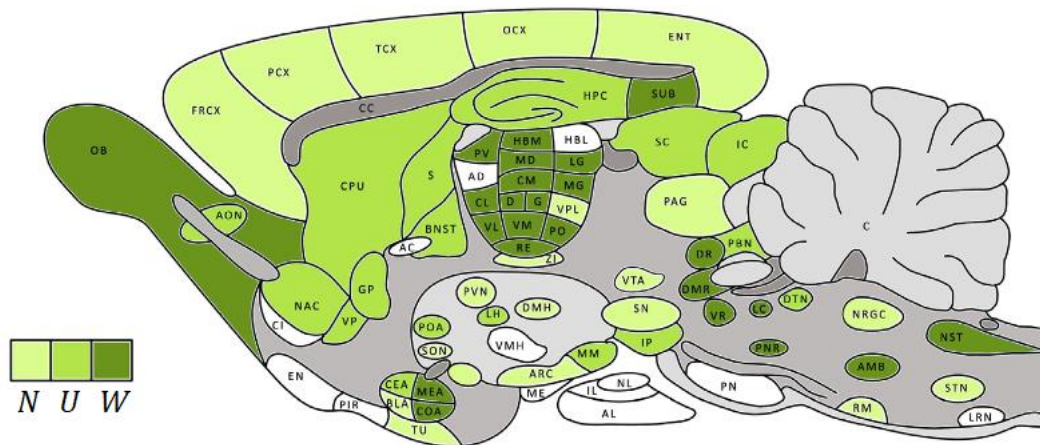
Receptor μ sklonowany został w latach 90-tych ubiegłego wieku (Chen i in., 1993; Wang i in., 1994). Istnieją dowody świadczące o wariantach genu kodującego ten receptor opierających się na alternatywnym splicingu, natomiast to, w jakim stopniu różne warianty wpływają na efekty opioidów, pozostaje nie do końca zbadane (Williams i in., 2013). Sugeruje się występowanie 3 różnych podtypów receptora μ : μ_1 , μ_2 oraz μ_3 , a funkcje każdego z nich są zróżnicowane. Najlepiej poznany - μ_1 - pośredniczy w ponadrdzeniowych i obwodowych efektach przeciwbólowych i z wysokim powinowactwem wiąże morfinę oraz enkefalinę, podczas gdy μ_2 , wiążący morfinę z niskim powinowactwem, jest zaangażowany w analgezję na poziomie rdzenia kręgowego oraz mediowane przez opioidy efekty oddechowe i w przewodzie pokarmowym (Dietis i in., 2011; Le Merrer i in., 2009). Wariant μ_3 jest najslabiej poznany, sugeruje się, że występuje na komórkach układu

odpornościowego i wiąże jedynie ligandy o budowie alkaloidowej, nie peptydowej (Cadet i in., 2003). W kontekście badań nad molekularnymi mechanizmami działania opioidów oraz projektowania nowych ligandów szczególne znaczenie miało odkrycie struktury krystalicznej receptorów opioidowych, w tym receptora μ (Manglik i in., 2012).

Receptor μ wykazuje wysoką ekspresję w ośrodkowym układzie nerwowym, szczególnie w strukturach związanych z transmisją bólową i reakcjami emocjonalnymi. Schematyczne rozmieszczenie receptorów μ w ośrodkowym układzie nerwowym przedstawiono na **Rycinie 2**. W przodomózgowiu ekspresję mRNA receptora μ wykryto m.in. w korze, opuszkach węchowych, prążkowie (jądrze ogoniastym i skorupie), jądrze półleżącym, gałce bladej, przegrodzie, jądrach ciała migdałowatego i hipokampie. W międzymózgowiu wysoka ekspresja mRNA receptora μ dotyczy przede wszystkim jąder uzdeczki, wzgórze i podwzgórze. Z kolei w śródmózgowiu receptory μ znajdują się w istocie czarnej, polu brzusznej nakrywki i istocie szarej okołowodociągowej. W pniu mózgu receptory μ zlokalizowane są w jądrach szwu i miejscu sinawym, jądrze dwuznacznym i jądrze pasma samotnego. Receptory μ znajdują się też w mózdzku, chociaż poziom ich ekspresji jest tam stosunkowo niski (Mansour i in., 1994, 1995). Ponadto, receptory μ zlokalizowane są w rogach grzbietowych rdzenia kręgowego i w zwojach korzeni grzbietowych (Besse i in., 1990).

Funkcje mediowane przez receptor μ są ściśle związane z ich lokalizacją. Receptor ten pośredniczy zatem w działaniu przeciwbólowym, zarówno na poziomie rdzeniowym, jak i ponadrdzeniowym, a endogenne układy opioidowe są bardzo istotną częścią sieci odpowiedzialnej za centralną modulację wrażeń bólowych. Aktywacja receptorów μ zlokalizowanych na nerwach obwodowych skutkuje lokalną analgezą, jednak nie jest ona antagonizowana przez nalokson, stąd uznawana jest za działanie niespecyficzne. Z kolei bezpośrednio podanie agonistów receptora μ w miejsce objęte stanem zapalnym może łagodzić objawy nadwrażliwości bólowej (hiperalgezji) (Stein i Lang, 2009). Na poziomie rdzeniowym receptory μ pełnią kluczową rolę w transmisji informacji bólowych biegnących nerwami obwodowymi do wyższych struktur mózgowych. Aktywacja receptorów opioidowych zlokalizowanych presynaptycznie prowadzi do zablokowania bramkowanych napięciem kanałów wapniowych (VGCC), co z kolei skutkuje zahamowaniem

uwalniania neuroprzebieżników o działaniu pronocyceptywnym. Z kolei pobudzenie receptorów zlokalizowanych postsynaptycznie prowadzi do aktywacji kanałów potasowych typu GIRK, co w efekcie wywołuje hiperpolaryzację neuronów projekcyjnych w drogach wstępujących (Yaksh i Wallace, 2017). Na poziomie ponadrdzeniowym agoniści receptorów μ mogą działać w wielu różnych obszarach. Przede wszystkim, pobudzenie receptorów μ hamuje neurony GABA-ergiczne w istocie szarej okołowodociągowej, co poprzez aktywację zstępujących dróg monoaminergicznych tłumi pobudliwość rogów grzbietowych rdzenia kręgowego i skutkuje analgezą (Fields, 2004). Ponadto, aktywacja receptorów opioidowych w obszarach korowych i podkorowych, w tym w strukturach limbicznych, przyczynia się do kontroli emocjonalnych aspektów odczuwania bólu, m.in. poprzez hamowanie pobudzającej transmisji glutaminianergicznej (Zheng, 2010; Zubieta i in., 2001).



Rycina 2. Schematyczne rozmieszczenie receptorów μ w mózgu szczura.

Stopień nasilenia ekspresji receptorów odpowiada nasyceniu koloru na rycinie (N – niski, U – umiarkowany, W – wysoki). Najwyższa ekspresja receptorów μ ma miejsce w opuszkach węchowych (OB), jądrach ciała migdałowatego (MEA, COA), jądrach wzgórza (PV, MD, LG, CM, MG, CL, D, G, VL, VM, PO, RE), przyśrodkowej uzdeczce (HBM), jądrach szwu (DR, DMR, VR), miejscu sinawym (LC), tworze siatkowatym (PNR), jądrze dwuznacznym (AMB) i jądrze pasma samotnego (NST). Stosunkowo wysoka ekspresja receptorów μ obejmuje także struktury prążkowie (CPU), jądro półleżące (NAC), gałkę błądą (GP), prążek krańcowy (BNST), przegrodę (S), hipokamp (HPC), wzgórki czworaczne (SC, IC). Receptory μ są także wyrażane w korze mózgowej (FRCX, PCX, TCX, OCX, ENT), istocie szarej okołowodociągowej (PAG), jądrze półleżącym przegrody (VTA), istocie czarnej (SN) i jądrze rdzeniowym nerwu trójdzielnego (STN).

Rycinę zaczerpnięto i zmodyfikowano: Przewłocki i Almeida (2017).

Wysoka ekspresja receptorów μ w strukturach układu limbicznego sprawia, że opioidy mają duży wpływ na regulację reakcji emocjonalnych i odpowiedź na bodźce stresogenne (Lutz i Kieffer, 2013). Istnieje znacząca grupa badań wskazujących, że układ opioidowy jest zaangażowany w regulację uczenia się emocjonalnego i stresu (Arico i McNally, 2014; Bali i in., 2015; Drolet i in., 2001; Przewłocki, 2002; Przewłocki i Almeida, 2017; Valentino i Van Bockstaele, 2014). Neuropeptydy opioidowe oraz ich białka receptorowe są funkcjonalnie powiązane z aktywnością osi stresu (podwzgórze-przysadka-nadnercza; ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA*) (Bilkei-Gorzo i in., 2008; Pascoe i in., 2008). Aktywacja układu stresowego przez czynnik uwalniający kortykotropinę (ang. *corticotropin-releasing factor, CRF*) stymuluje wydzielanie β -endorfin z podwzgórza, które zwrótnie hamują aktywność układu stresowego (Nikolarakis i in., 1986). W mózgach zwierząt laboratoryjnych poddanych stresowi izolacji odnotowano obniżoną ekspresję genów kodujących receptory μ i κ (Haj-Mirzaian i in., 2019). Z drugiej strony, u myszy z nokautem receptorów μ zaobserwowano osłabienie behawioralnej odpowiedzi na stres i związany z tym niższy poziom kortykosteronu (Ide i in., 2010). W niektórych aspektach kierunek wpływu receptorów μ na odpowiedź na stres pozostaje niejednoznaczny.

Coraz więcej danych wskazuje, że aktywność układu opioidowego jest bezpośrednio związana z zaburzeniami nastroju występującymi w przebiegu depresji. Badania podkreślają udział endogennych peptydów opioidowych, w tym β -endorfin, w patofizjologii tej choroby (Hegadoren i in., 2009). Do niedawna większość badań skoncentrowanych na poszukiwaniu skutecznych, przeciwdepresyjnych środków farmakologicznych wywierających efekt poprzez receptory opioidowe skupiona była na receptorze κ , gdyż wykazano, że antagonizm tego receptora może osłabiać objawy związane z depresją (Li i in., 2016; Lutz i Kieffer, 2013; Mague i in., 2003; Shirayama i in., 2004). Mechanizm kontroli nastroju, w którym pośredniczą receptory μ jest bardziej złożony. Zarówno badania przedkliniczne, jak i dane kliniczne wskazują na przeciwdepresyjne działanie buprenorfiny, która jest częściowym agonistą receptora μ , chociaż posiada także powinowactwo wobec receptora ORL-1 (agonista), oraz κ i δ (antagonista; Browne i in., 2015; Emrich i in., 1982; Falcon i in., 2015; Serafini i in., 2018). Wykazano także, że przeciwdepresyjne działanie tianeptyny wymaga zaangażowania receptorów μ

(Samuels i in., 2017), a w ostatnich próbach wyjaśniania mechanizmu przeciwdepresyjnych efektów ketaminy zaczęto podkreślać wagę komponenty opioidowej (Klein i in., 2020). Pojawiają się badania sugerujące, że również bezpośrednia aktywacja receptorów μ również może skutkować zmianami behawioralnymi interpretowanymi jako osłabienie objawów przypominających depresję u gryzoni. Wykazano, że agoniści receptora μ (w tym morfina i tramadol) zmniejszają się czas bezruchu w teście zawieszenia za ogon, uważanego za miarę bezradności behawioralnej w odpowiedzi na stresujący bodziec (Berrocoso i in., 2013). Podobny efekt morfiny zaobserwowano także w teście wymuszonego pływania (Zomkowski i in., 2005). Choć rola receptorów μ w zaburzeniach depresyjnych nie jest dokładnie poznana, na podstawie dostępnych danych wydaje się, że ich aktywacja może przyczyniać się do osłabiania pewnych symptomów związanych z depresją i redukować bezpośrednią odpowiedź na stres w modelach zwierzęcych.

Jednym z zaburzeń psychicznych, w którym układ opioidowy, w tym receptory μ , odgrywają istotną rolę jest zespół stresu pourazowego (ang. *posttraumatic stress disorder, PTSD*). PTSD rozwija się u części osób narażonych na traumatyczne doświadczenie. Osoby cierpiące na to zaburzenie zmagają się z uporczywymi wspomnieniami, koszmarami i retrospekcjami traumy (Pitman i in., 2012). Badania na zwierzętach wykazały, że farmakologiczne manipulacje ukierunkowane na receptory opioidowe zmieniają zachowanie gryzoni w modelu PTSD, jakim jest warunkowanie strachem (McNally i Westbrook, 2003; Szklarczyk i in., 2015). Dane eksperymentalne wskazują, że okołotraumatyczna aktywność endogennego układu opioidowego stanowi czynnik protekcyjny rozwoju PTSD. Zablokowanie tego układu przez nioselektywnego antagonistę receptorów opioidowych nasila nabywanie reakcji uwarunkowanego strachu (Szklarczyk i in., 2015). Co interesujące, odnotowano, że podania morfiny u osób po doświadczeniu traumy zapobiegają rozwojowi PTSD (Bryant i in., 2009; Holbrook i in., 2010; Saxe i in., 2001). Podobne działanie morfiny odwzorowano także przy wykorzystaniu modeli zwierzęcych, które jednocześnie powiązały ten efekt z mediowanym przez morfinę zaburzeniem konsolidacji pamięci związanej z traumą (Castellano i in., 1994; Szklarczyk i in., 2015, 2016).

Warto nadmienić, że receptory μ mediują szereg efektów fizjologicznych, które są jednocześnie ich działaniami niepożądanymi. Ekspresja receptorów μ w sieci oddechowej pnia mózgu, w tym na komórkach prekompleksu Bötzingera i jądra Köllikera-Fusego, ma ścisły związek z występowaniem objawów depresji oddechowej w następstwie pobudzenia tych receptorów. Depresja oddechowa jest główną przyczyną zgonów związanych z zażywaniem opioidów i wydaje się specyficznie zależna od receptorów μ , gdyż ich usunięcie z krytycznych obszarów pnia mózgu blokuje objawy depresji oddechowej wywoływanej przez opioidy (Bachmutsky i in., 2020). Z kolei aktywacja receptorów μ zlokalizowanych w przewodzie pokarmowym związana jest głównie z hamowaniem pasażu jelitowego przez presynaptyczne blokowanie uwalniania przekaźników pobudzających z neuronów regulujących skurcze mięśni gładkich (Sobczak i in., 2014). Zaparcia są jednym z poważniejszych działań niepożądanych leków opioidowych w praktyce klinicznej, a wraz z nimi często współwystępują nudności, wymioty, wzdęcia i bóle brzucha. Uniknięcie niepożądanych objawów ze strony układu pokarmowego pozostaje jednym z celów projektowania nowych agonistów receptorów opioidowych (Farmer i in., 2019).

Receptory μ odgrywają kluczową rolę w mechanizmach związanych ze wzmocnieniem pozytywnym i odczuwaniem nagrody, przez co mają duże znaczenie w hedonistycznych aspektach uzależnienia (Trigo i in., 2010). Objawy związane z uzależnieniem były szczegółowo badane w ramach niniejszej rozprawy, dlatego też temu zagadnieniu poświęcono kolejny podrozdział.

Uzależnienie od opioidów

Opioidy są jednymi z najczęściej nadużywanych substancji uzależniających, a ich przyjmowanie wiąże się z poważnymi negatywnymi skutkami ubocznymi, które zwykle są bardziej poważne niż w przypadku innych substancji psychoaktywnych (National Collaborating Centre for Mental Health UK, 2008). Według klasyfikacji DSM-5 Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego (ang. *American Psychiatric Association, APA*), medycznym terminem opisującym uzależnienie od opioidów są tzw. zaburzenia związane z używaniem opioidów (ang. *opioid use disorder, OUD*). Definiowane są one jako konieczność czasowego lub stałego pobierania opioidu, występujące wraz z zaniedbywaniem innych aktywności (na rzecz przyjmowania

opioиду), bez względu na wynikające z tego konsekwencje mające wpływ na zdrowie oraz poziom życia jednostki (American Psychiatric Association, 2013).

Uzależnienie jest przewlekłą chorobą ośrodkowego układu nerwowego, której etiopatogeneza nie została dotychczas całkowicie poznana. W jej powstaniu mają udział zarówno czynniki biologiczne, psychologiczne, jak i społeczne. Charakteryzuje się utratą kontroli nad zachowaniami, które kierowane są przymusem ciągłego lub okresowego poszukiwania i przyjmowania substancji uzależniającej w celu doświadczenia psychicznych skutków jej działania lub uniknięcia nieprzyjemnych objawów związanych z jej brakiem. Uzależnienie jest zaburzeniem chronicznym - typowe dla niego są uporczywe nawroty, które mogą pojawiać się nawet po bardzo długim okresie abstynencji. Uważa się, że mechanizm wszystkich uzależnień, włącznie z behawioralnymi, jest podobny, a u jego podłoża leżą zbliżone zaburzenia neurobiologiczne (Liu i Li, 2018; Wise i Koob, 2014).

Większość osób początkowo używa substancji opioidowych w celu osiągnięcia charakterystycznego „haju” lub osłabienia odczuwania bólu (także w przypadku opioidów przepisywanych na receptę). Jednak wielokrotne stosowanie opioidów, poprzez desensytyzację receptorów, powoduje rozwój tolerancji, co z kolei może prowadzić do ich niekontrolowanego przyjmowania. Typowy przebieg OUD obejmuje początkowy okres rekreacyjnego stosowania opioidów, w którym dominują efekty nagradzające. Następnie, ze względu na tolerancję, jednostka zmuszona jest do przyjmowania coraz wyższych dawek substancji, aby uzyskać ten sam efekt. Okresy abstynencji wiążą się z występowaniem głodu narkotyku (ang. craving) i zachowaniami związanymi z poszukiwaniem substancji (ang. drug-seeking), a odstawieniu towarzyszą poważne objawy fizjologiczne (ból mięśni i kości, łzawienie, biegunka i skurcze brzucha) i psychologiczne (pobudzenie, lęk), co zwykle skutkuje ponownym zażyciem substancji w celu złagodzenia nieprzyjemnych wrażeń (Dydyk i in., 2021; Wang i in., 2019).

Neurobiologiczne podłoże uzależnienia od opioidów stanowi przede wszystkim aktywność układu nagrody mózgu (mezo limbicznego układu dopaminergicznego). Jest on zbudowany z projekcji dopaminergicznych wychodzących z pola brzusznej nakrywki w śródmózgowiu i docierających do

różnych struktur układu limbicznego, zwłaszcza do jądra półleżącego przegrody, będącego mózgowym ośrodkiem przyjemności (Everitt i Robbins, 2005).

Opioidy oddziałują na układ dopaminowy zarówno w polu brzusznej nakrywki, gdzie blokują hamujące interneurony, jak i bezpośrednio w jądrze półleżącym przegrody. W polu brzusznej nakrywki opioidy działają poprzez receptory μ zlokalizowane na interneuronach GABA-ergicznym. Aktywacja receptorów μ zlokalizowanych na interneuronach GABA-ergicznym prowadzi do ich zahamowania, a więc w konsekwencji skutkuje odhamowaniem neuronów dopaminergicznych, nasileniem ich aktywności i wzrostem uwalniania dopaminy w jądrze półleżącym przegrody (Johnson i North, 1992). Opioidy działają także w jądrze półleżącym przegrody w sposób niezależny od dopaminy, poprzez bezpośrednią aktywację receptorów wyrażanych przez neurony tam zlokalizowane (Koob, 1992). Co istotne, chroniczna ekspozycja na opioidy prowadzi do zmian adaptacyjnych w układzie nagrody. „Upregulacja” cAMP w jądrze półleżącym przegrody, która jest molekularnym markerem zależności od opioidów, może prowadzić do upośledzenia funkcji dopaminy w układzie nagrody i w efekcie przyczyniać się do stanu awersji podczas odstawienia od substancji (Nestler, 1996). Chociaż u ludzi agoniści receptora μ mają zwykle działanie sedacyjne, u myszy laboratoryjnych, w sposób zależny od genotypu i dawki, nasilają aktywność lokomotoryczną, która wydaje się zależeć właśnie od uwalniania dopaminy w układzie mezo limbicznym (Belknap i in., 1998; Zarrindast i Zarghi, 1992).

Receptory μ odgrywają kluczową rolę nie tylko w uzależniających efektach opioidów, lecz pośredniczą także w pozytywnym wzmocnieniu powstającym w następstwie ekspozycji na inne substancje uzależniające, w tym alkohol, kannabinoindy czy nikotynę, dlatego dokładne poznanie i zrozumienie funkcji tego receptora ma znaczenie dla farmakoterapii uzależnień lekowych (Contet i in., 2004). W praktyce klinicznej opracowano strategie polegające zarówno na blokowaniu (nalokson, naltrekson), jak i na częściowej aktywacji (metadon, buprenorfina) receptorów μ . Są one stosowane głównie w kontekście uzależnienia od opioidów, ale odniosły też pewien sukces w leczeniu alkoholizmu (Noble i in., 2015).

Jednym z naglących problemów zdrowotnych, społecznych i ekonomicznych jest tzw. epidemia opioidowa, czyli kryzys związany z nadużywaniem substancji

opiodowych, stanowiący ogromne wyzwanie dla zdrowia publicznego (Blanco i in., 2020; Skolnick, 2018). Wybuchł on w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie i ogłoszony został najbardziej śmiertelnością epidemią narkotykową w historii Ameryki (Dydyk i in., 2021). Problem sięga lat 90-tych ubiegłego wieku, kiedy to w Stanach Zjednoczonych drastycznie wzrosła liczba osób, którym przepisywano na receptę silne opiodowe środki przeciwbólowe, przede wszystkim oksykodon. Był to proces wspierany i napędzany przez firmy farmaceutyczne, które początkowo przekonywały, że nie są to środki silnie uzależniające. Stworzono nawet pojęcie „pseudouzależnienia” (ang. *pseudoaddiction*), zgodnie z którym leki opiodowe miałyby wywoływać jedynie tzw. uzależnienie psychiczne, bez wpływu na zmiany o podłożu biologicznym (Greene i Chambers, 2015). Leki takie jak oksykodon bardzo często były przepisywane bez wyraźnych lub bez wystarczających wskazań medycznych. Powstały prywatne kliniki leczenia bólu zwane „fabrykami prochów” (ang. *pill mills*), gdzie dla korzyści majątkowych podawano ludziom silnie uzależniające opioidy. W efekcie wiele osób zmarło z przedawkowania lub zaczęło sięgać po narkotyki z czarnego rynku, aby uniknąć ciężkich objawów wynikających z odstawienia (Kaczmarek, 2020). Epidemia zaczęła przybierać na sile. O jej zasięgu świadczą chociażby dane statystyczne, według których około 53 miliony osób (1,1% ogólnej populacji między 15 a 64 rokiem życia) nadużywało opiodów w 2019 roku (International Narcotics Control Board, 2019). O tempie rozwoju epidemii świadczy z kolei fakt, iż między 1999 a 2017 rokiem odnotowano sześciokrotny wzrost liczby zgonów wywołanych przedawkowaniem opiodów. Konieczność intoksykacji po przedawkowaniu opiodów jest coraz częstsza – między 2017 a 2018 rokiem podwoiła się liczba recept na nalokson, czyli najbardziej popularny lek używany do szybkiego odwrócenia efektów związanych z przedawkowaniem (U.S. Department of Health and Human Services, 2021). Pomimo że kryzys związany z nadużywaniem opiodów rozgrywa się przede wszystkim w Stanach Zjednoczonych, niepokojące tendencje w tym obszarze obserwuje się także w Europie. Wzrost użycia opiodów przepisywanych na receptę dotyczy przede wszystkim Holandii (Verhamme i Bohnen, 2019). Trend wzrostowy odnotowano także w Hiszpanii (Hurtado i in., 2020) i Wielkiej Brytanii (Alenezi i in., 2021). Eksperci zwracają uwagę na negatywny wpływ pandemii COVID-19 na przebieg epidemii opiodowej, która nie tylko stanowi poważne utrudnienia w dostępie do terapii uzależnienia oraz

towarzyszących mu chorób i zaburzeń psychicznych, ale negatywnie wpływa też na dobrostan psychiczny, prowadząc część osób w stronę samoleczenia się substancjami uzależniającymi (Khatri i Perrone, 2020; Narayan i Balkrishnan, 2021). Epidemia opioidowa jest więc jednym, choć nie jedynym powodem, dla którego konieczność aktywnego poszukiwania, projektowania i testowania nowych związków opioidowych o osłabionym profilu działań niepożądanych jest dużym wyzwaniem dla współczesnej neuropsychofarmakologii.

2. Selektyność funkcjonalna ligandów receptorów opioidowych

Rozwój wiedzy o farmakologii układu opioidowego, a także potrzeba poszukiwania opioidów o osłabionych działaniach niepożądanych znajduje odzwierciedlenie w licznych próbach opracowania bezpieczniejszych i słabiej uzależniających związków. Wśród tych podejść ważne miejsce zajmuje idea selektyności funkcjonalnej ligandów, nazywana także stronniczym agonizmem (ang. *functional selectivity/biased agonism*). W drugiej części wstępu przedstawiono zagadnienie selektyności funkcjonalnej oraz teoretyczne uzasadnienie działań ukierunkowanych na opracowanie stronniczych agonistów receptora μ . Opisano także główne efekty działania selektywnych funkcjonalnie opioidów odkrytych do tej pory.

Selektyność funkcjonalna ligandów receptorów związanych z białkiem G

Selektyność funkcjonalna ligandów, nazywana także stronniczym agonizmem (ang. *biased agonism*), to koncepcja, zgodnie z którą agonista jest w stanie aktywować receptor w sposób funkcjonalnie selektywny, tj. wywierać efekt biologiczny poprzez preferencyjną aktywację wybranej wewnątrzkomórkowej ścieżki przekazywania sygnału. Pierwotnie sądzono, że po związaniu się z receptorem metabotropowym, następuje zmiana konformacji receptora, co skutkuje aktywacją białka G i zaangażowaniem wtórnych przekaźników, dzięki czemu receptor może przekazywać sygnał danego szlaku fizjologicznego. Obecnie uważa się jednak, że sygnalizacja zależna od receptorów GPCR stanowi raczej złożoną sieć ścieżek, których aktywacja może przebiegać z różną preferencją (Kenakin, 2015). β -arr2, białko pośredniczące w odczulaniu i internalizacji receptorów, może rekrutować szereg

innych białek sygnałowych, stanowiąc przykład sygnalizacji niezależnej od białka G (Violin i Lefkowitz, 2007). Ligandy, których celem działania jest ten sam receptor, mają zdolność do stabilizowania jego odmiennych konformacji, co przekłada się na specyficzną rekrutację białek G i β -arestyn, a w efekcie prowadzi do różnych odpowiedzi wewnątrzkomórkowych i efektów fizjologicznych, a nawet behawioralnych.

Podsumowując, zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, receptory związane z białkiem G aktywują wiele szlaków wewnątrzkomórkowych, a niektóre ligandy, które wyróżniają się selektywnością funkcjonalną, mogą preferencyjnie stymulować określone ścieżki (Wingler i Lefkowitz, 2020). W związku z tym agonistów receptorów związanych z białkiem G można ogólnie podzielić na agonistów niewykazujących selektywności funkcjonalnej wobec jakiegokolwiek ścieżki (ang. *balanced agonist*), agonistów selektywnych funkcjonalnie wobec białka G (ang. *G protein-biased agonist*) oraz agonistów selektywnych funkcjonalnie wobec β -arr2 (ang. *β -arr2-biased agonist*). Badania nad zjawiskiem selektywności funkcjonalnej stwarzają możliwość identyfikacji wewnątrzkomórkowych ścieżek przekazywania sygnału, które są preferowane dla efektów terapeutycznych lub odpowiadają (przynajmniej w pewnym stopniu) za niepożądane efekty aktywacji danego receptora. Dzięki temu selektywność funkcjonalna stwarza możliwość oddzielenia terapeutycznych efektów liganda od działań niepożądanych, które to przez lata uważano za nierozzerwalnie powiązane. W ostatnim czasie selektywność funkcjonalna stała się jednym z najszybciej rozwijających się obszarów w farmakologii receptorów GPCR. Dotyczy wielu grup substancji farmakologicznych, których celem działania są m.in. receptory adrenergiczne (α_1 i β_2), dopaminowe (D_{2L} i D_1), angiotensynowe (1A), serotoninowe (5-HT₂ i 5HT_{1A}) oraz opioidowe (μ , δ i κ). Selektywność funkcjonalna otwiera możliwości poszukiwania nowych leków o bardziej atrakcyjnym, a przede wszystkim bezpieczniejszym profilu działania. Niemniej, efekty określonych substancji *in vivo* mogą znacząco różnić się od założeń przyjętych na etapie projektowania *in silico* oraz testów *in vitro*. Idea wymaga więc gruntownego przebadania każdego liganda z uwzględnieniem różnych parametrów farmakologicznych oraz behawioralnych skutków jego podania.

Badania nad rolą β -arestyny-2 w powstawaniu niepożądanych działań agonistów receptorów opioidowych

Idea selektywności funkcjonalnej agonistów receptora opioidowego μ ma źródło w badaniach na modelach myszy transgenicznym pozbawionych β -arr2. β -arr2 jest białkiem wewnątrzkomórkowym pełniącym funkcje regulacyjne. Jej podstawową rolą jest blokowanie przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego przez receptory związane z białkiem G. Pobudzony przez agonistę receptor może aktywować jednocześnie wiele cząsteczek białka G, dlatego proces ten musi podlegać kontroli w celu uniknięcia niekontrolowanej stymulacji szlaków przekazywania sygnału. Jest to proces naturalny, gdyż stale aktywny receptor dezorganizowałoby działanie komórki, co z kolei skutkowałoby stanami patologicznymi. Odczulenie receptora (nazywane też desensytyzacją) to mechanizm, przez który fosforylacja oraz przyłączenie w ufosforylowanym miejscu β -arr2 hamuje katalityczną aktywność receptora przez blokowanie reszt zaangażowanych w wiązanie białka G. W efekcie sygnał zostaje stłumiony (Allouche i in., 2014). Część receptorów związanych z białkiem G po desensytyzacji ulega endocytozie, czyli internalizacji. Proces ten zachodzi kilka minut po stymulacji receptora przez agonistę i także wymaga aktywności β -arr2. Internalizacja polega na usunięciu receptora z błony komórkowej, w której się znajduje, do pęcherzyków endoplazmatycznych, z których może wrócić do błony lub zostać zdegradowany przez lizosomy. Za usunięcie receptora z błony komórkowej odpowiedzialne są kompleksy białkowe zbudowane z β -arr2 oraz związanej z nią klatryny (Raehal i Bohn, 2014).

Intensywne badania nad rolą β -arr2 w powstawaniu działań niepożądanych związanych z podaniem opioidów prowadzone były na przełomie XX i XXI wieku, kiedy to stworzono model myszy, które nie posiadały genu kodującego β -arr2 (tzw. nokaut β -arr2). Myszy zostały gruntownie przebadane pod kątem tego, w jaki sposób działa na nie morfina. Okazało się, że podanie morfiny u tych zwierząt charakteryzowało się wyższą efektywnością oraz dłuższym czasem działania (Bohn i in., 1999). Ponadto u myszy z mutacją nie zaobserwowano rozwoju tolerancji na antynocyceptywny efekt morfiny (Bohn i in., 2000). Myszy z nokautem β -arr2 miały także osłabione skutki uboczne podania morfiny, takie jak depresja ośrodka oddechowego i zaparcia (Raehal i in., 2005). W ramach obserwacji zachowań

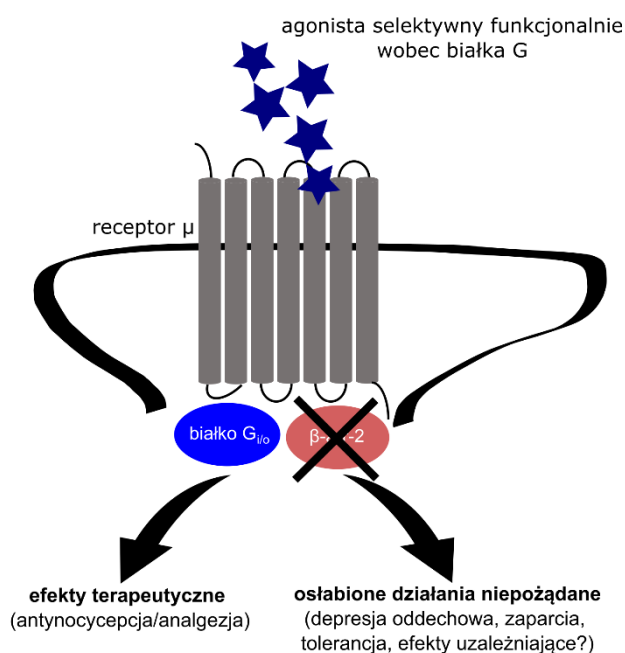
Wstęp

związanych z uzależniającym działaniem morfiny odnotowano, że nokauty β -arr2 wykazywały nasilenie aktywności lokomotorycznej, jednak w stopniu niższym niż zwierzęta kontrolne (Bohn i in., 2003). Z drugiej strony myszy pozbawione β -arr2 wykazywały zwiększoną wrażliwość na nagradzające właściwości morfiny w paradygmacie warunkowej preferencji miejsca, czemu towarzyszyło nasilone uwalnianie dopaminy w prążkowie (Bohn i in., 2003). Z kolei fizyczna zależność, mierzona za pomocą objawów odstawienia precypitowanego podaniem naloksonu u myszy uzależnionych od morfiny, pozostała niezmienną (Bohn i in., 2000) lub lekko osłabiona jedynie w przypadku niskiej dawki opioidu (Raehal i Bohn, 2011). Zaobserwowano także, że chroniczne podania morfiny doprowadziły do wzrostu aktywności cykazy adenylowej, będącej molekularnym markerem zależności od morfiny, zarówno u mutantów, jak i u myszy kontrolnych (Bohn i in., 2000), co w połączeniu z danymi behawioralnymi skłania do stwierdzenia, że wpływ β -arr2 na zależność fizyczną od morfiny nie występuje lub jest bardzo niewielki. Co ciekawe, Raehal i Bohn (2011) wykazały, że przynajmniej część z opisanych powyżej, zależnych od β -arr2 różnic, jest specyficzna dla morfiny, ponieważ hamowanie tolerancji nie występowało u zwierząt z mutacją, którym chronicznie podawano oksykodon, metadon lub fentanyl. Zwierzęta te nie różniły się także pod kątem nasilenia objawów odstawienia od chronicznie podawanego opioidu.

Znaczenie β -arr2 w efektach działania morfiny było także badane przy wykorzystaniu innych modeli doświadczalnych. Funkcjonalne wyciszenie β -arr2 za pomocą podań antysensownych oligonukleotydów ukierunkowanych na to białko spowodowało opóźnienie rozwoju tolerancji na antynocycepcję morfinową, a także spowolniło rozwój allodynii w szczurzym modelu bólu neuropatycznego (Przewłocka i in., 2002). Podobne rezultaty zaobserwowano też w modelu, w którym szczurom otrzymującym morfinę podawano dodatkowo małe interferujące RNA (siRNA) wyciszające β -arr2. W porównaniu do zwierząt kontrolnych (otrzymujących jedynie morfinę) prezentowały one nasiloną antynocycepcję, osłabioną tolerancję i zmniejszone objawy odstawienia wywołane naloksonem (Yang i in., 2011).

Podsumowując, przytoczone powyżej badania stały się uzasadnieniem dla hipotezy, że wykluczenie lub ograniczenie aktywności β -arr2 może przyczynić się do lepszego profilu bezpieczeństwa agonistów receptora μ oraz osłabienia przynajmniej niektórych aspektów związanych z ich potencjałem uzależniającym (**Rycina 3**).

W ciągu ostatnich lat stan wiedzy na ten temat znacząco się jednak rozwinął, a rola β -arr2 w działaniach niepożądanych agonistów opioidowych okazała się bardziej skomplikowana, niż początkowo przypuszczano. Te aspekty były intensywnie badane przez różne zespoły naukowe, równoległe do okresu, w którym powstawały badania wchodzące w skład niniejszej rozprawy. Omówienie tych kwestii zawarte zostało w Dyskusji.



Rycina 3. Hipoteza dotycząca efektów *in vivo* agonistów receptora opioidowego μ selektywnych funkcjonalnie wobec białka G.

Przyłączenie do receptora agonisty selektywnego wobec ścieżki zależnej od aktywacji białka $G_{i/o}$, który w minimalnym stopniu angażuje β -arr2, może prowadzić do osiągnięcia terapeutycznych efektów związanych z pobudzeniem receptora (antynocypcji/analgezji) przy jednoczesnym braku typowych dla konwencjonalnych agonistów receptora μ działań niepożądanych, a więc depresji oddechowej, zaparc i prawdopodobnie przynajmniej niektórych efektów związanych z uzależnieniem.

Przegląd efektów działania selektywnych funkcjonalnie opioidów w badaniach podstawowych i klinicznych

Agoniści receptorów opioidowych, charakteryzujący się selektywnością funkcjonalną wobec szlaku sygnałowego zależnego od aktywacji białka G, mogą wywierać efekt farmakologiczny przez aktywację receptorów opioidowych każdego typu. Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy efektów agonistów receptora μ , ponieważ zostali oni wybrani do badań z uwagi na to, że są najczęściej stosowanymi

klinicznie opioidami w farmakoterapii bólu (Pathan i Williams, 2012) oraz fakt, że są silnie uzależniające, a receptor μ odgrywa kluczową rolę w mechanizmach uzależnień lekowych (Contet i in., 2004). Niemniej, pokrótce wspomniane zostaną także efekty działania selektywnych funkcjonalnie agonistów receptorów κ i δ .

Konwencjonalni agoniści receptora κ są wykorzystywani w leczeniu bólu, a także redukują świąd (Cowan i in., 2015). W odróżnieniu od agonistów receptorów μ i δ , agoniści receptora κ wywołują negatywny stan afektywny, a ich podanie wiąże się z awersją lub dysforią, stąd też antagoniści tego receptora wykazują korzystne działanie w zaburzeniach nastroju oraz uzależnieniach lekowych (Chavkin, 2018; Jacobson i in., 2020). Do tej pory odkryto kilka związków o agonistycznym działaniu na receptor κ i jednocześnie selektywności funkcjonalnej wobec białka G (Mores i in., 2019). Związki aktywujące receptor κ i preferencyjnie działające przez szlak sygnałowy związany z białkiem G wykazują zróżnicowane działanie *in vivo*. W niektórych przypadkach mają jednak przewagę nad agonistami aktywującymi obie ścieżki sygnałowe, gdyż przy zachowaniu właściwości terapeutycznych, mogą nie wywoływać objawów anhedonii, awersji czy dysforii (Mores i in., 2019).

Z kolei konwencjonalni agoniści receptora δ stanowią interesującą grupę związków wykazujących skuteczność w różnych stanach związanych z bólem przewlekłym (w których to zazwyczaj efektywność tracą agoniści receptora μ), a ponadto mogą działać przeciwdepresyjnie (Pradhan i in., 2011). Agoniści tego receptora posiadający selektywność funkcjonalną wobec białka G to jednak wciąż słabo poznana grupa związków, gdyż większość dotychczasowej uwagi poświęcono agonistom receptorów μ i κ . Conibear i in. (2020) przedstawili interesujące wyniki, które wskazują, że ograniczenie sygnalizacji zależnej od β -arr2 pozwala na uzyskanie działania przeciwbólowego agonisty w modelu bólu chronicznego (bez rozwoju tolerancji) i wywołuje efekt przeciwdepresyjny, a jednocześnie pozwala uniknąć typowych dla niektórych agonistów receptora δ drgawek, negatywnego wpływu na ośrodek oddechowy i efektów nagradzających.

Agoniści receptora μ preferencyjnie działający poprzez szlak sygnałowy związany z białkiem G to zdecydowanie największa i najbardziej popularna grupa związków wśród opioidów selektywnych funkcjonalnie. W tej grupie wyróżnić można zarówno substancje pochodzenia naturalnego, jak i związki chemiczne celowo

projektowane przy wykorzystaniu zaawansowanych metod modelowania molekularnego. Jeden z najbardziej znanych agonistów z tej grupy, TRV130 (olicerydyna), wywoływał skuteczną antynocycepcję przy jednoczesnym osłabieniu zaparć i objawów depresji oddechowej u zwierząt (DeWire i in., 2013). W przebiegu chronicznych podań tego agonisty odnotowano osłabienie rozwoju tolerancji na jego działanie antynocyceptywne (Altarifi i in., 2017; Liang i in., 2019; Mori i in., 2017), podczas gdy wciąż obserwowano występowanie symptomów zależności fizycznej objawiającej się zespołem odstawienia (Liang i in., 2019). W niskich, ale wywołujących efekt antynocyceptywny dawkach, obserwowano brak efektów nagradzających (Liang i in., 2019; Manglik i in., 2016), ale dane uzyskane w testach mierzących działanie wzmacniające były niejednoznaczne (Altarifi i in., 2017; Austin Zamarripa i in., 2018; Schwienteck i in., 2019). Działanie TRV130 miało zatem pewną przewagę nad efektami klasycznych agonistów receptora μ , co doprowadziło do tego, że związek przetestowano w badaniach klinicznych i w połowie 2020 roku został on zarejestrowany do użytku medycznego (leczenie bólu ostrego u osób dorosłych w kontrolowanych warunkach szpitalnych lub ambulatoryjnych) przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration, FDA*; FDA, 2020). Był to jeden z pierwszych selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ , którego działanie badano na szeroką skalę oraz którego profil farmakologiczny okazał się mieć przewagę nad konwencjonalnymi agonistami tego receptora, co doprowadziło do przeprowadzenia badań klinicznych faz 1-3 (Fossler i in., 2018; Singla i in., 2019; Soergel, Subach, Burnham i in., 2014; Soergel, Subach, Sadler i in., 2014; Viscusi i in., 2016) i zakończonego sukcesem procesu rejestracji w Stanach Zjednoczonych.

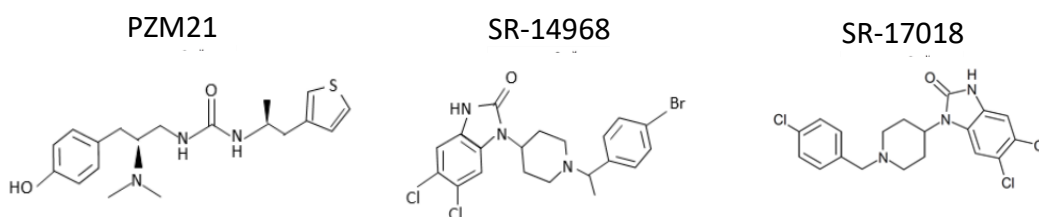
W ostatnich latach substancje chemiczne o takim profilu działania były intensywnie badane, gdyż idealnie wpasowały się w nurt poszukiwania bezpiecznych i niezależniających (lub słabiej uzależniających) leków opioidowych. Trzy nowoodkryte związki wybrane zostały do badań będących podstawą niniejszej rozprawy. **Tabela 2** przedstawia podstawowe informacje na temat tych agonistów. Są to dane opublikowane w pracach naukowych, które były jednocześnie doniesieniami raportującymi odkrycie związków (Manglik i in., 2016; Schmid i in., 2017). Działanie tych agonistów było równoległe badane przez różne grupy naukowe, dlatego omówienie późniejszych wyników badań w porównaniu do

wyników badań własnych zawarto w Dyskusji. Na **Rycinie 4** przedstawiono natomiast struktury chemiczne agonistów badanych w niniejszej pracy.

Tabela 2. Selektywni funkcjonalnie agoniści receptora opioidowego μ wybrani do badań własnych – dane z prac opisujących odkrycie związków.

Agonista	Współczynnik selektywności funkcjonalnej	Najważniejsze efekty behawioralne
PZM21*	niska wartość stopnia rekrutacji β -arr2 w teście BRET uniemożliwiła obliczenie współczynnika selektywności funkcjonalnej, (poziom rekrutacji białka G_i (E_{max}) w eseju GTP γ S wyniósł $1,02 \pm 0,03$)	- osłabianie tzw. „afektywnej” reakcji na bodziec bólowy w teście gorącej płytki, brak efektów na odruchy rdzeniowe w teście odsuwania ogona, - w porównaniu do równoważnej dawki morfiny nie odnotowano objawów depresji oddechowej oraz zaobserwowano słabszy wpływ na hamowanie perystaltyki jelit, - brak nasilenia aktywności lokomotorycznej i działania nagradzającego w teście warunkowanej preferencji miejsca (badano jedynie niską dawkę, tj. 20 mg/kg);
SR-14968**	ligand referencyjny - DAMGO: GTP γ S/ β -rr2=36 cAMP/ β -rr2=5,1	- osłabianie reakcji na bodziec bólowy w testach gorącej płytki i odsuwania ogona, - słabszy wpływ na depresję oddechową (w porównaniu do morfiny);
SR-17018**	ligand referencyjny - DAMGO: GTP γ S/ β -arr2=85 cAMP/ β -arr2=40	- osłabianie reakcji na bodziec bólowy w testach gorącej płytki i odsuwania ogona, - słabszy wpływ na depresję oddechową (w porównaniu do morfiny);

*Manglik i in. (2016), **Schmid i in. (2017)



Rycina 4. Struktury chemiczne selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ wybranych do badań.

Podsumowując, do badań wybrano PZM21 oraz dwóch agonistów z grupy związków SR, tj. SR-14968 i SR-17018. Współczynnik selektywności funkcjonalnej (ang. *bias factor*) różni się w tym wypadku w zależności od eseju komórkowego wybranego do jego obliczenia (wiązanie GTP γ S lub hamowanie akumulacji cAMP

stymulowanego forskoliną), ale w porównaniu do liganda referencyjnego (DAMGO) osiąga wysoką wartość świadcząca o preferencyjnym działaniu na szlak białka G. Współczynnik taki nie został zaprezentowany w sposób liczbowy dla PZM21, ponieważ rekrutacja β -arr2 osiągała poziom tak niski, że uniemożliwiający przeprowadzenie formalnej analizy. Wstępne badanie działania tych agonistów *in vivo* pozwoliło natomiast stwierdzić, że działają antynocyceptywnie (choć w przypadku PZM21 nie wykazano skuteczności na poziomie działania na odruchy rdzeniowe) i nie wpływają negatywnie na ośrodek oddechowy, co wskazywało na obniżone ryzyko wystąpienia depresji oddechowej. W przypadku PZM21 stwierdzono także mniejsze ryzyko zapać i brak występowania pewnych zachowań związanych z efektami nagradzającymi. Charakterystyka wpływu wymienionych agonistów na różne zachowania związane z uzależnieniem, a także ich skuteczności w przebiegu chronicznych podań, w momencie wyboru związków do projektu doktorskiego nie była jednak przeprowadzona. Biorąc pod uwagę nie do końca poznaną i kontrowersyjną rolę β -arr2 w rozwoju uzależnienia, interesującym zagadnieniem wydała się ocena działania agonistów receptora μ selektywnych wobec szlaku białka G w modelach zachowań związanych z uzależnieniem. Ponadto, wciąż otwartym tematem pozostaje potencjał terapeutyczny selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ w schorzeniach innych niż ból, w tym w chorobach neuropsychiatrycznych takich jak uzależnienie i zaburzenia związane ze stresem.

Cel badań

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zbadano efekty nowych agonistów receptora opioidowego μ charakteryzujących się selektywnością funkcjonalną wobec wewnątrzkomórkowej ścieżki sygnałowej związanej z aktywnością białka G. Związki chemiczne o agonistycznym działaniu na receptor μ , preferencyjnie aktywujące ścieżkę sygnałową zależną od białka G wielokrotnie były proponowane jako bezpieczniejsza i słabiej uzależniająca alternatywa dla konwencjonalnych opioidów stosowanych w warunkach klinicznych. W ostatnich latach stan wiedzy na ten temat bardzo dynamicznie się rozwija, a kolejne hipotezy związane z mechanizmami i efektami działania selektywnych funkcjonalnie agonistów receptorów opioidowych są nieustannie weryfikowane.

Ogólnym celem badań było określenie terapeutycznych efektów wybranych agonistów receptora μ oraz ocena ich potencjału uzależniającego, jako jednego z głównych działań niepożądanych tej grupy substancji. Doświadczenia miały charakter behawioralny, jednak w niektórych przypadkach uzupełnione zostały o dane biochemiczne. Do badań wybrano związek PZM21 oraz dwa związki z grupy SR, tj. SR-14968 oraz SR-17018.

Szczegółowe cele obejmowały następujące zadania badawcze:

1. Ocena antynocyceptywnych efektów PZM21, SR-14968 i SR-17018.

Aby zrealizować cel zbadano wpływ jednorazowego podania PZM21, SR-14968 oraz SR-17018 na wrażliwość zwierząt na bólowy bodziec termiczny w schemacie dawka-odpowiedź.

2. Charakterystyka uzależniającego potencjału PZM21, SR-14968 oraz SR-17018.

Realizacja celu obejmowała przeprowadzenie doświadczeń mierzących wpływ agonistów na rozwój tolerancji na ich działanie antynocyceptywne, a także zależność fizyczną przejawiającą się występowaniem zespołu odstawienia. Ponadto badano wywołaną przez te związki aktywność lokomotoryczną oraz efekty nagradzające w paradygmacie warunkowanej preferencji miejsca.

Cel badań

W przypadku PZM21 dodatkowo zbadano jego działanie wzmacniające oraz poszukiwanie substancji w okresie abstynencji w modelu dożylnego samopodawania substancji.

3. Zbadanie wpływu PZM21, SR-14968 i SR-17018 na behawioralne efekty morfiny.

Cel obejmował eksperymenty mierzące wpływ podań agonistów na antynocyceptywne działanie morfiny oraz rozwój tolerancji na ten efekt. Ponadto oceniono wpływ badanych związków na nasilenie objawów odstawienia u myszy uzależnionych od morfiny, a w przypadku PZM21 dodatkowo na nagradzające efekty morfiny w modelu warunkowanej preferencji miejsca.

4. Ocena wpływu PZM21 na efekty stresu.

Cel zrealizowano przez zbadanie wpływu PZM21 na zachowania związane ze stresem (odpowiedź na stres wymuszonego pływania i zawieszenia za ogon oraz zachowania lękowe). Zbadane zostało także działanie PZM21 w modelu PTSD (warunkowanie strachem).

Wyniki uzyskane w ramach realizacji wymienionych powyżej zadań badawczych uzupełniono danymi dodatkowymi, których celem było lepsze wyjaśnienie i dyskusja otrzymanych rezultatów. Dane dodatkowe dotyczyły wpływu PZM21 na zdolności poznawcze, zewnątrzkomórkowy poziom monoamin w prądkowiu, a także stopień aktywacji białka G. W ramach danych dodatkowych zaprezentowano także wyniki pomiaru powinowactwa badanych agonistów do receptorów opioidowych oraz ich wpływ na występowanie reakcji Strauba.

Podsumowując, realizacja wymienionych powyżej zadań badawczych miała na celu sformułowanie wniosków dotyczących antynocyceptywnych efektów agonistów wybranych do badań, a także ich potencjału uzależniającego i możliwych efektów terapeutycznych, wśród których wyróżniono zdolność do modulacji behawioralnych efektów morfiny (w tym jej potencjału uzależniającego) oraz wpływ na efekty stresu.

Materiały i metody

1. Zwierzęta

W eksperymentach wykorzystano gryzonie laboratoryjne (myszy i szczury). Dobór gatunku i szczepu oparty był na literaturze i wcześniejszych doświadczeniach, a motywowany był względami metodologicznymi. **Tabela 3** przedstawia podsumowanie klasyfikacji zwierząt wybranych do doświadczeń.

Tabela 3. Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach.

Gatunek	Szczep, płeć i wiek	Pochodzenie	Rodzaj eksperymentów
Mysz domowa (<i>mus musculus</i>)	C57BL/6J, samce, > 8 tyg.	hodowla własna Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk (Kraków)/ Charles River (Hamburg)	- wrażliwość bólowa po podaniu ip., - rozwój tolerancji na działanie antynocycetywne, - zależność fizyczna i zespół odstawienia wywołany podaniem naloksonu, - aktywność lokomotoryczna, - warunkowana preferencja miejsca, - zdolności poznawcze, - warunkowanie strachem, - mikrodializa mózgu;
Mysz domowa (<i>mus musculus</i>)	CD-1 Albino Swiss, samce, > 8 tyg.	Charles River (Hamburg)	- natychmiastowa odpowiedź na stres (testy wymuszonego pływania i zawieszenia za ogon), - zachowania związane z lękiem (test jasnego/ciemnego pudełka);
Szczur wędrowny (<i>rattus norvegicus</i>)	Wistar, samce, > 8 tyg.	Charles River (Hamburg)	- wrażliwość bólowa po podaniu ith.;
Szczur wędrowny (<i>rattus norvegicus</i>)	Sprague Dawley, samce, > 8 tyg.	hodowla własna Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk (Kraków)	- dożylne samopodawanie substancji;

Materiały i metody

Jak przedstawiono w tabeli, większość doświadczeń przeprowadzono na myszach szczepu C57BL/6J, gdyż szczep ten jest użyteczny w modelowaniu zachowań związanych z uzależnieniem, a działanie opioidów u tych myszy jest dobrze poznane (Belknap i in., 1989; Orsini i in., 2005). Do badania efektów PZM21 w testach wymuszonego pływania, zawieszenia za ogon i jasnego/ciemnego pudełka wykorzystano myszy CD-1 Albino Swiss. Było to motywowane zamiarem porównania działania morfiny (kontroli pozytywnej) do danych dostępnych w literaturze (Berrocoso i in., 2013; Zomkowski i in., 2005). W doświadczeniu, w którym badano działanie nardzeniowo podawanego PZM21, wykorzystano szczury Wistar, Uwarunkowane było to kwestiami metodologicznymi, czyli możliwością podpajęczynówkowej implantacji kateterów według protokołu przyjętego w laboratorium. Podobne względy przyczyniły się do wyboru szczurów Sprague Dawley do doświadczenia związanego z dożylnym samopodawaniem substancji.

Myszy eksperymentalne przebywały w grupie od 7 do 10 w jednej klatce domowej ze wzbogaconym środowiskiem, natomiast szczury (oraz myszy wykorzystane w eksperymencie mikrodializy mózgu) przebywały w osobnych klatkach, z uwagi na to, iż doświadczenia na nich prowadzone wymagały przeprowadzenia czynności operacyjnych i względy bezpieczeństwa wymagały izolacji osobników. Klatki domowe wykonane były z pleksiglasu. W pomieszczeniach, w których przebywały zwierzęta, utrzymywana była stała temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) oraz wilgotność ($50\pm 5\%$). Utrzymywany był cykl dobowy światło-ciemność po 12 godzin (faza jasna w dzień). Zwierzęta miały nieograniczony dostęp do pokarmu (Special Diets Services, Anglia) oraz wody. Doświadczenia przeprowadzano w fazie jasnej.

Doświadczenia były prowadzone zgodnie z regulacjami Unii Europejskiej i Dyrektywą 2010/63/EU oraz otrzymały pozytywną opinię II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (numery zgód: 1213/2015, 1305/2016, 66/2017, 84/2018, 261/2019, 31/2020, 351/2020, 114/2021, 196/2021).

Zwierzęta były losowo przypisywane do grup eksperymentalnych. Całkowita liczba zwierząt oraz możliwy dystres i cierpienie były ograniczane, zgodnie z zasadą 3R (Russell i Burch, 1959). Rozplanowanie i liczebność grup eksperymentalnych przedstawiono w **Tabeli 4**.

Tabela 4. Rozplanowanie i liczebność grup eksperymentalnych.

Rycina	Grupa	Liczba zwierząt
5	Sól fizj., PZM21 80	9
	PZM21 20, PZM21 40	8
	Morf 10	7
6	Sól fizj., PZM21 20, PZM21 40, PZM21 80	10
	Morf 10	7
7	Sól fizj., PZM21 5,	6
	PZM21 2,5, PZM21 7,5	7
8 i 9	Sól fizj. + PZM21 40	11
	Cyp+PZM21 40	9
10 i 11	Rozpuszcz., SR-14968 0,3, SR-14968 1, Morf 10	10
	SR-14968 3	7
12 i 13	Rozpuszcz., SR-17018 24, SR-17018 48, Morf 10	10
	SR-17018 8	9
14	Sól fizj., PZM21 20, PZM21 40	9
	PZM21 80	10
	Morf 10	7
15	Sól fizj., PZM21 20, PZM21 40, PZM21 80	10
	Morf 10	16
16 i 17	Sól fizj., PZM21 40, Morf 10	9
	PZM21 20, PZM21 80	10
18	Sól fizj., PZM21 20, PZM21 40, PZM21 80, Morf 10	10
19 i 20	Sól fizj.	6
	PZM21 0,05, PZM21 0,5	8
	Oxy 0,06	13
21	Rozpuszcz., SR-17018 24, Morf 10	10
	SR-14968 1	9
22	Rozpuszcz., SR-14968 0,3, Morf 10	10
	SR-17018 24	9
23	Rozpuszcz., SR-14968 1, SR-17018 24, Morf 10	10
24	Rozpuszcz., SR-17018 24, Morf 10	10
	SR-14968 1	9
25	Rozpuszcz.	9
	SR-14968 1, SR-17018 24	10
	Morf 10	8
26	Sól fizj. + Morf 5, PZM21 20 + Morf 5, PZM21 40 + Morf 5	10
27	Sól fizj. + Morf 10, PZM21 20 + Morf 10, PZM21 40 + Morf 10	8
		10
28	Morf + Sól fizj. + Nlx, Morf + PZM21 20 + Nlx, Morf + PZM21 40 + Nlx	10

Materiały i metody

29	Sól fizj. + Morf 10	14
	PZM21 20 + Morf 10	10
	PZM21 40 + Morf 10	13
30	Rozpuszcz. + Morf 5, SR-14968 0,3 + Morf 5, SR-17018 8 + Morf 5	9
31	Rozpuszcz. + Morf 10, SR-14968 1 + Morf 10, SR-17018 24 + Morf 10	10
32	Morf + Rozpuszcz. + Nlx, Morf + SR-14968 1 + Nlx, Morf + SR-17018 24 + Nlx	9
33	Sól fizj., PZM21 40	10
	PZM21 20, Morf 10, Morf 20	9
34	Sól fizj., PZM21 20, PZM21 40	10
	Morf 10, Morf 20	9
35	Sól fizj., PZM21 20, PZM21 40, Morf 10, Morf 20	10
36	Sól fizj., Morf 1	8
	PZM21 20, PZM21 40, Morf 20	9
	Morf 10	7
37	Sól fizj., PZM21 40	10
	PZM21 20	9
38	Sól fizj.	9
	PZM21 20	8
	PZM21 40	10
39 i 40	Sól fizj., PZM21 40, PZM21 80, Morf 10, Morf 20	5

2. Badane substancje

W badaniach wykorzystano selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ (PZM21, SR-14968 i SR-17018) oraz odpowiednie substancje kontrolne: morfinę (Pharma Cosmetic, Polska) lub oksykodon (Mundipharma, Polska) jako nieselektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ (kontrola pozytywna) oraz sól fizjologiczną lub rozpuszczalnik (1% DMSO, 10% Kolliphor HS 15 (Sigma Aldrich, USA), 89% dH₂O), które stanowiły kontrole negatywne odpowiednio dla PZM21 oraz agonistów SR. W niektórych procedurach doświadczalnych użyto także antagonistów receptorów opioidowych, tj. cyprodime (selektywnego antagonistę receptora μ ; Tocris, USA) oraz naloksonu (nieselektywnego antagonistę receptorów opioidowych; Merck, Polska). Objętość iniekcji wynosiła 10 ml/kg (podania ip.).

Syntezę funkcjonalnie selektywnych agonistów receptora μ przeprowadzono w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii

Nauk na podstawie opublikowanych wcześniej procedur (Manglik i in., 2016; Schmid i in., 2017). Czystość enancjomeryczną otrzymanych związków potwierdzono za pomocą analizy widm NMR.

3. Procedury operacyjne

Implantacja kateterów do podań nardzeniowych

Nardzeniowe podania substancji odbywały się przez katetery implantowane szczurom znieczulonym pentobarbitalem (60 mg/kg, ip.; Biowet Puławy, Polska) według metody opisanej przez Yaksha i Rudy'ego (1976). Cewnik polietylenowy (PE 10, Intramedic, Clay Adams, Becton Dickinson and Company, Rutherford, USA) został wysterylizowany przez przepłukanie 70% etanolem, a następnie sterylną wodą. Szczury umieszczano na stoliku stereotaktycznym (David Kopf Instruments, USA) i wykonywano nacięcie w błonie szczytowo-potylicznej. Następnie ostrożnie wprowadzano cewnik do przestrzeni podpajęczynówkowej do poziomego odcinka lędźwiowego (L4–L6) rdzenia kręgowego, przepłukiwano 10 μ l sterylnej wody i zabezpieczano końcówką. Po operacji zwierzętom zapewniono 7 dni regeneracji, a przez 2 pierwsze dni podawano im enrofloksacynę (0,1 ml, sc.; KRKA, Słowenia). Podania nardzeniowe (ith.) wykonano przy użyciu strzykawki Hamiltona o pojemności 50 μ l. Każdemu zwierzęciu wstrzykiwano 5 μ l badanej substancji farmakologicznej, a następnie 10 μ l soli fizjologicznej.

Implantacja kateterów do dożylnego samopodawania substancji

Szczury znieczulano podaniem ketaminy (100 mg/kg, ip.; Biowet Puławy, Polska) i ksylazyny (10 mg/kg, ip.; Biowet Puławy, Polska) i wszczepiano im silikonowe cewniki, umieszczając je w żyłę szyjnej. W celu implantacji cewników używano kaniuli prowadzącej (C313G, Plastics One Inc., USA), przymocowanej do silikonowej rurki (Bio-Sil, Bio-Rad, USA) i siatki Marlex za pomocą cementu dentystycznego i umieszczano je podskórnym między łopatkami, wyprowadzając przez skórę przez otwór biopsyjny (3 mm). Drugi koniec rurki był wprowadzany na głębokość 3 cm do prawej żyły szyjnej, a następnie bezpiecznie przyszywany do leżącej poniżej tkanki mięśniowej. Po operacji zwierzętom zapewniono 7 dni regeneracji, podczas których cewniki przepłukiwano 0,3 ml soli fizjologicznej i 0,2 ml

roztworu heparyny (Braun, Niemcy), aby zapobiec niedrożności kateterów. Wszystkie zwierzęta otrzymały lek przeciwzapalny i przeciwbólowy (tolfedynę 4%, 1 ml/kg, ip.; Vetoquinol Biowet, Polska) i 5 ml glukozy. Przez 3 dni po operacji zwierzętom podawano antybiotyki, dodając je do wody pitnej (Sul-Tridin 24%, Biowet Puławy, Polska).

Implantacja kaniul dializacyjnych do mikrodializy mózgu

U myszy wywoływano anestezję przez podania ketaminy (7,5 mg/kg, ip.; Biowet Puławy, Polska) i ksylazyny (1 mg/kg, ip.; Biowet Puławy, Polska) i umieszczano je na stoliku stereotaktycznym (David Kopf Instruments, USA). Następnie za pomocą współrzędnych dostępnych w atlasie stereotaktycznym (Paxinos i Franklin, 2019) i oczyszczeniu szwów punktu Bregma, określano miejsce implantacji kaniuli dializacyjnej w prążkowie (w mm w stosunku do Bregmy: AP +1,0, L +1,8 i V -3,8). Za pomocą wiertarki w wyznaczonych punktach wywiercano otwór w czaszce i wykorzystując zamontowany na stoliku stereotaktycznym uchwyt, wprowadzano pionowo do tkanki mózgowej kaniulę dializacyjną (MAB 10.8.2.Cu; AgnTho's, Szwecja) na głębokość zgodną z parametrami powyżej. Kaniulę przytwierdzano do czaszki cementem dentystycznym (Heraeus, Dentalon Plus, AgnThos, Szwecja) i umieszczano w niej pionową sondę do mikrodializy. Doświadczenie przeprowadzono następnego dnia.

4. Pomiar wrażliwości nocyceptywnej

Test odsuwania ogona

Zwierzęta umieszczano w aparacie służącym do pomiaru reakcji odsuwania ogona (Ugo Basile, Włochy), a następnie wiązkę światła (termiczny bodziec nocyceptywny) kierowano na tylną część ogona i za pomocą automatycznego cyfrowego stopera mierzono czas reakcji odsunięcia ogona przez zwierzę. Pomiar po podaniu substancji farmakologicznych wykonywane były w kilku punktach czasowych (szczegóły podano w sekcji wyników), natomiast przed podaniem substancji przeprowadzany był pomiar wyjściowej wrażliwości na bodziec nocyceptywny. Aby zapobiec możliwości uszkodzenia ogona, maksymalny czas ekspozycji ogona na światło ustalono na 9 sekund (czas zaprzestania). Efekty

antynocyceptywne substancji przedstawione są jako % maksymalnej odpowiedzi (%MPE) według formuły $\%MPE = (\text{czas reakcji} - \text{czas wyjściowy}) / (\text{czas zaprzestania} - \text{czas wyjściowy}) \times 100$. Na podstawie danych uzyskanych w teście odsuwania ogona obliczono także wysokość dawki ED₅₀ badanych agonistów (czyli dawki, która powoduje określone zmiany biologiczne u 50% organizmów testowanych). Wykorzystano w tym celu metodę Tallaridy i Murray'a (1987).

Test gorącej płytki

Do przeprowadzenia testu używano aparatu gorącej/zimnej płytki (Ugo Basile, Włochy). Zwierzę umieszczane było na gorącej (52,5°C) płaskiej powierzchni i za pomocą cyfrowego stopera mierzono latencję wystąpienia charakterystycznej reakcji. Wyróżniono dwa typy reakcji: energiczne potrząśnięcie/cofnięcie tylnej łapy oraz lizanie łapy/skok. Każdy typ reakcji obserwowano osobno podczas tego samego pomiaru. Pomiar po podaniu substancji farmakologicznych wykonywany był w jednym punkcie czasowym, natomiast przed podaniem substancji przeprowadzany był pomiar wyjściowej wrażliwości na bodziec nocyceptywny. W celu niedopuszczenia do wystąpienia uszkodzeń tkanki, maksymalny czas ekspozycji na gorącą płytkę ustalono na 30 sekund (czas zaprzestania). Efekty antynocyceptywne substancji przedstawione są jako % maksymalnej odpowiedzi (%MPE) według formuły podanej powyżej.

5. Ocena zachowań związanych z uzależnieniem

Tolerancja

Pomiar rozwoju tolerancji na działanie antynocyceptywne przeprowadzono przy użyciu testu odsuwania ogona w sposób opisany powyżej. Myszy otrzymywały podania substancji przez 7 kolejnych dni. Reakcja w teście odsuwania ogona mierzona była w jednym punkcie czasowym w 1, 3, 5 oraz 7 dniu doświadczenia.

W celu zbadania wpływu selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ na rozwój tolerancji na antynocyceptywne działanie morfiny zastosowano model doświadczalny, w którym substancje te (PZM21, SR-14968, SR-17018) każdorazowo podawano 30 minut przed morfiną. Pomiar rozwoju tolerancji przeprowadzano zgodnie ze sposobem opisanym powyżej.

Zależność fizyczna (odstawienie precypitowane naloksonem)

Do pomiaru objawów zależności fizycznej wyrażającej się w nasileniu zespołu odstawienia wykorzystano dwa modele doświadczalne. Pierwszy z nich zastosowano w celu zbadania wpływu selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ na rozwój zależności fizycznej, którą oceniano za pomocą obserwacji objawów odstawienia po podaniu naloksonu (4 mg/kg, ip.) u zwierząt chronicznie otrzymujących badane związki (przez 5 kolejnych dni, dwa razy dziennie o 8.00 i 16.00, ip.). Następnie, w 6 dniu eksperymentu, myszy otrzymały ostatnie poranne podanie agonistów, a po upływie 3 godzin podawano im nalokson (4 mg/kg, ip.) i na 15 minut umieszczano je w przezroczystych, plastikowych tubach (średnica: 20 cm, wysokość: 50 cm) i obserwowano objawy odstawienia. Model ten został wcześniej zweryfikowany (Abdel-Zaher i in., 2006), a wybrany został z uwagi na to, że opiera się na podaniach stałych dawek opioidu (wysokość dawek odnotowano w sekcji wyników), co w przypadku badań nowych związków chemicznych znacząco ułatwiało przeprowadzenie doświadczenia oraz interpretację wyników i porównanie ich do efektów morfiny.

Z kolei w celu oceny wpływu selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ na precypitowany naloksonem zespół odstawienia u myszy uzależnionych od morfiny zastosowano model polegający na podawaniu wzrastających dawek morfiny, 3 razy dziennie o 8.00, 12.00 i 16.00 przez 4 kolejne dni (dzień 1: 10 mg/kg, dzień 2: 20 mg/kg, dni 3 i 4: 40 mg/kg; sc.). Następnie, w 5 dniu eksperymentu, myszy otrzymały ostatnie poranne podanie morfiny (40 mg/kg), a po upływie 3 godzin podawano im nalokson (4 mg/kg, ip.) i na 15 minut umieszczano w przezroczystych, plastikowych tubach i obserwowano objawy odstawienia. Model został wielokrotnie zweryfikowany w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej IF PAN (np. Solecki i in., 2019; Tertil i in., 2021), a wybrany został ze względu na to, że prowadzi do rozwoju silnej zależności fizycznej i intensywne odstawienie, co było niezbędne w celu zbadania modulującego wpływu nowych związków chemicznych na te objawy. Selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ podawano 30 minut przed naloksonem.

W przypadku obydwu modeli obserwowano ten sam zespół zachowań, które oceniano ilościowo (zgrzytanie zębami, potrząsanie całym ciałem (ang. *wet dog*

shakes), skoki, wspięcia na tylne łapy, drzenie łap) lub jakościowo (intensywność defekacji w skali 0-1-2). Nasilenie zespołu odstawienia oceniano za pomocą liczby skoków (jako najbardziej charakterystycznego objawu odstawienia u myszy) oraz łącznego efektu odstawienia obliczanego za pomocą wzoru: łączny efekt odstawienia = (liczba zgrzytnięć zębami x 1,5) + (liczba potrząśnięć całego ciała x 1,5) + (ilość wspięć na tylne łapy x 0,1) + (ilość drzeń łap x 0,5) + intensywność defekacji. Wzór przyjęto na podstawie publikacji Skupio i in. (2017).

Aktywność lokomotoryczna po jednorazowych i wielokrotnych podaniach substancji

Pomiar aktywności lokomotorycznej i rozwoju sensytyzacji/tolerancji tego efektu przeprowadzony został w klatkach o wymiarach 10 x 20 x 10 cm wyposażonych w fotokomórki (klatki wykonane na zamówienie dla IF PAN). Dzień przed rozpoczęciem właściwego doświadczenia przeprowadzono adaptację zwierząt do klatek, umieszczając je w nich na 2 godziny. W trakcie kolejnych 6 dni aktywność lokomotoryczną zwierząt (mierzonych jako całkowita liczba przecięć fotokomórek) mierzono przez 2 godziny od podań odpowiednich substancji. Po upływie kolejnych 8 dni tj. w 14 dniu trwania eksperymentu, powtarzano pomiar w sposób analogiczny jak wcześniej, aby zbadać ekspresję aktywności lokomotorycznej.

Warunkowana preferencja miejsca

Test warunkowanej preferencji miejsca, służący pomiarowi nagradzających właściwości badanych substancji, oparto na modelu wielokrotnie wykorzystywanym w badaniach prowadzonych w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej IF PAN (np. Parkitna i in., 2012; Sikora i in., 2016; Solecki i in., 2009). Testy przeprowadzono w aparatach (Med Associates, USA) składających się z dwóch kompartymentów warunkowych (15 x 15 x 15 cm) przedzielonych ruchomymi drzwiami i mniejszym, szarym pomieszczeniem. Kompartymenty różniły się kolorem ścianek oraz kolorem i fakturą podłóg. Pierwszy z nich był czarny i miał białą, karbowaną podłogę, natomiast drugi był biały i miał czarną podłogę z okrągłymi otworami. Dzień przed rozpoczęciem właściwego doświadczenia przeprowadzono adaptację myszy do aparatów, która polegała na możliwości swobodnej eksploracji całego aparatu przez 5 minut.

W kolejnym dniu przeprowadzano pretest, w czasie którego mysz umieszczano w środkowym pomieszczeniu ze swobodnym dostępem do całego aparatu na 20 minut. Fotokomórki automatycznie zliczały czas spędzany przez zwierzę w każdej z części aparatu. Po preteście jeden z kompartymentów kojarzony był z podaniem agonisty opioidowego (lub soli fizjologicznej/rozpuszczalnika w przypadku grup kontrolnych; warunkowanie nagradzające), a drugi z solą fizjologiczną/ rozpuszczalnikiem (warunkowanie kontrolne). Przydział substancji do danego kompartymentu był zależny od wyników uzyskanych w preteście. Podania morfiny i selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ skojarzono z kompartymentem mniej preferowanym. Rozkład grup eksperymentalnych przeprowadzono w taki sposób, aby wewnątrz każdej z grup preferencja obu kompartymentów była zbliżona (brak istotnych statystycznie różnic w czasie spędzonym w każdym z kompartymentów dla każdej z grup). Kolejny etap doświadczenia – faza warunkowania – trwał 10 dni, w których zwierzęta otrzymywały podania (ip.) soli fizjologicznej/rozpuszczalnika (warunkowania kontrolne – dni 1, 3, 5, 7, 9) lub testowanych substancji (warunkowania nagradzające – dni 2, 4, 6, 8, 10), po czym były natychmiast umieszczane w odpowiednich kompartymentach na 1 godzinę (w porównaniu do oryginalnej procedury czas ten wydłużono z 40 minut z uwagi na wolno rozwijające się działanie badanych agonistów w testach nocycyptywnych). Po 24 godzinach od ostatniego warunkowania przeprowadzano posttest, który wyglądał analogicznie jak pretest. Wartość preferencji miejsca obliczano odejmując czas w postteście spędzany w kompartymencie skojarzonym z warunkowaniem kontrolnym od czasu w postteście spędzanego w kompartymencie skojarzonym z warunkowaniem nagradzającym.

Aby zbadać wpływ PZM21 na warunkowaną preferencję miejsca wywoływaną morfiną, 30 minut przed każdą z nagradzających sesji warunkowania zwierzętom podawano PZM21 (przed sesjami warunkowania kontrolnego podawano sól fizjologiczną).

Dożylnie samopodawanie substancji

Procedurę samopodawania przeprowadzono zgodnie z modelem opisanym wcześniej przez Soleckiego i in. (2013, 2018). Poprzedzono ją 3 dniami ograniczenia

pożywienia do ok. 90% ilości swobodnie spożywanej. Następnie szczury trenowano w standardowych klatkach Skinnera (Med Associates, USA) zgodnie ze schematem wzmocnienia FR1 (ang. *fixed ratio 1*), a więc każdorazowe naciśnięcie aktywnej dźwigni (przypisanej jako „aktywna” przed rozpoczęciem testów) skutkowało infuzją odpowiedniej substancji i prezentacją bodźca warunkowego, czyli sygnału dźwiękowego i światełka przez 6 sekund. Po naciśnięciu aktywnej dźwigni i związanych z tym konsekwencjach następowało 20 sekund, podczas których ponowne naciśnięcie tej dźwigni nie miało żadnych efektów. Każdorazowe naciśnięcie dźwigni nieaktywnej nie miało żadnych skutków. Każdy szczur przechodził 10 sesji samopodawania trwających po 2 godziny. W następnych dniach zwierzęta poddawano wymuszonej abstynencji. W tym okresie nie otrzymywały one żadnych substancji i przebywały w klatkach domowych. Dodatkowo zadbano, aby nie miały kontaktu z bodźcami mogącymi kojarzyć się z wcześniejszym samopodawaniem substancji. W 3 dniu wymuszonej abstynencji zwierzęta ponownie umieszczano w klatkach Skinnera, a naciśnięcie dźwigni aktywnej prowadziło do prezentacji bodźców warunkowych, ale nie skutkowało infuzją substancji. Pozostałe warunki eksperymentalne pozostały niezmiennione. Ten etap doświadczenia miał na celu modelować zachowania związane z poszukiwaniem substancji (ang. *drug-seeking*) w odpowiedzi na bodźce kontekstualne (klatka) oraz dyskretne bodźce warunkowe (sygnał dźwiękowy i światełko po naciśnięciu dźwigni aktywnej).

Reakcja Strauba

Reakcja (ogon) Strauba polega na uniesieniu (często niemal pionowo) i usztywnieniu ogona myszy i szczurów po podaniu opioidów i jest wynikiem skurczu mięśni u podstawy ogona (Bilbey i in., 1960). Zjawisko to zostało po raz pierwszy opisane przez Strauba (1911). Wydaje się, że zależne jest od aktywacji receptorów μ_2 zlokalizowanych w ośrodkowym układzie nerwowym (Nath i in., 1994). Obserwacja reakcji Strauba może być użyteczna w celu porównania nowych substancji do substancji dobrze znanych, w tym przypadku morfiny (ang. *morphine-like activity*). Podejmowano próby korelowania reakcji Strauba z potencjałem uzależniającym substancji psychoaktywnych. Stwierdzono pozytywny związek między występowaniem reakcji Strauba a ryzykiem uzależniającego działania u ludzi (Shemano i Wendel, 1964). Choć wiarygodność takiego wnioskowania nie została

ostatecznie potwierdzona, w praktyce laboratoryjnej obserwuje się zależność między ogonem Strauba a prawdopodobieństwem, że dany związek chemiczny wywoła objawy przypominające uzależnienie u gryzoni. Mając to na uwadze, obserwowano czy podania (ip.) PZM21, SR-14968 i SR-17018 wpływają na pojawienie się reakcji Strauba u myszy. Za reakcję Strauba uznawano uniesienie ogona pod kątem minimum 45°.

6. Pomiar bezpośredniej odpowiedzi na stres, lękowości oraz pamięci związanej ze strachem

Test wymuszonego pływania

Test służy do oszacowania behawioralnej korelaty bezradności (ang. *behavioral despair*) u gryzoni w sytuacji silnego, nieuniknionego stresu (Porsolt i in., 1977). Myszy umieszczano pojedynczo w szklanej zlewce (wysokość: 28 cm, średnica: 15 cm) z wodą (wysokość słupa wody: ok. 20 cm, temperatura: 26±1°) na 6 minut. W czasie testu mierzono latencję pierwszego epizodu bezruchu (definiowanego jako brak ruchu myszy trwający dłużej niż 2 sekundy z wyjątkiem ruchów niezbędnych do utrzymania się na powierzchni wody i oddychania) oraz łączny czas trwania epizodów bezruchu.

Test zawieszenia za ogon

Podobnie jak test wymuszonego pływania, test zawieszenia za ogon umożliwia pomiar bezradności behawioralnej u gryzoni w sytuacji silnego, nieuniknionego stresu. Myszy mocowano pojedynczo za ogon (za pomocą plastra) do platformy zawieszanej na wysokości 30 cm nad podłożem. W czasie 6 minut badania mierzono latencję pierwszego epizodu bezruchu (definiowanego jako brak ruchu myszy trwający dłużej niż 2 sekundy z wyjątkiem ruchów niezbędnych do oddychania), jak również łączny czasu trwania wszystkich epizodów bezruchu. W przypadku, gdy mysz wspinała się po własnym ogonie, eksperymentator delikatnie przywracał mysz do prawidłowej pozycji.

Test jasnego/ciemnego pudełka

Test jasnego/ciemnego pudełka wykorzystuje fakt, że gryzonie z powodu lęku unikają jasnych i otwartych przestrzeni (Bourin i Hascoët, 2003). Myszy umieszczano pojedynczo na środku ciemnego ramienia jasnego/ciemnego pudełka tyłem do przejścia łączącego ramię jasne (biała podłoga i białe ściany o wymiarach 18 x 16 x 20cm, oświetlenie: 400 luksów) i ciemne (czarna podłoga i czarne ściany o wymiarach 18 x 16 x 20cm, oświetlenie: 50 luksów). Następnie przez 5 minut mierzono czas spędzany w jasnym i ciemnym ramieniu, latencję wejścia do jasnego ramienia oraz liczbę przejść między obiema częściami (zdefiniowanych jako przekroczenie czterema łapami granicy między jasnym a ciemnym ramieniem).

Warunkowanie strachem

Model warunkowania strachem i pomiaru pamięci związanej ze strachem oparto na publikacjach Szklarczyk i in. (2015, 2016). Test składa się w treningu oraz 3 sesji wystawienia na kontekst. Trening trwał 7 minut 10 sekund i składał się z 2 minut adaptacji do klatki do warunkowania strachem (Ugo Basile, Włochy) oraz aplikacji 5 szoków elektrycznych (każdy o natężeniu 1 mA trwający 2 sekundy). Były one dostarczane poprzez podłogę zbudowaną z metalowych prętów podłączoną do generatora prądu w interwałach czasowych trwających 1 minutę. Z kolei wystawienia na kontekst (związane z odpamiętywaniem traumatycznego doświadczenia, tj. aplikacji szoków elektrycznych) trwały 3 minuty i przeprowadzone zostały 24, 72 i 120 godzin po treningu (1, 3 i 5 dni po warunkowaniu). Polegały one na umieszczeniu myszy w tych samych klatkach, w których odbywał się trening. Kontekst skojarzony z traumatycznym doświadczeniem był bodźcem przypominającym traumę. Behawioralnym wskaźnikiem odpamiętania traumy była reakcja zastygania (ang. *freezing*), a jej czas był automatycznie zliczany przez program ANY-maze (Stoelting, USA).

7. Ocena zdolności poznawczych

Labirynt w kształcie litery Y

Test umożliwia pomiar zdolności poznawczych w zakresie pamięci roboczej. Myszy umieszczano pojedynczo na końcu jednego z ramion labiryntu w kształcie

literę Y ze swobodnym dostępem do pozostałych dwóch ramion (wymiary ramion: 35 x 7 x 5 cm, kąt rozwarcia ramion 120°). Każde z trzech ramion labiryntu Y służyło jako ramię startowe, przy czym przyporządkowanie myszy do ramienia dokonywano w taki sposób, aby każde ramię służyło jako startowe tyle samo razy. Przez 5 minut śledzono kolejność wejść myszy do ramion, a otrzymane dane analizowano następnie z uwzględnieniem następujących parametrów: SAP (ang. *spontaneous alteration performance*) – 3 kolejne wejścia do różnych ramion, AAR (ang. *alternate arm returns*) – 2 kolejne wejścia do różnych ramion, SAR (ang. *same arm returns*) – 2 kolejne wejścia do tego samego ramienia. Dane przedstawiono zgodnie z formułami: % SAP = liczba SAP / (liczba wszystkich wejść do ramion – 2) x 100; % AAR (SAR) = liczba AAR (SAR) / (liczba wszystkich wejść do ramion – 1) x 100.

Test rozpoznawania nowego obiektu

Test umożliwia pomiar zdolności poznawczych w zakresie pamięci długotrwałej. Procedura składa się z dwóch części: treningu (poprzedzonego adaptacją do aparatu, w którym przeprowadzany jest test) oraz testu właściwego. W fazie treningu myszy pojedynczo umieszczano w wolnym polu (klatka o wymiarach 40 x 40 x 60 cm), w którym znajdowały się dwa identyczne obiekty A (plastikowa przezroczysta tuba z kolorowym papierem w środku i zakrętką; obiekty umieszczano po przekątnej w dwóch rogach klatki) i przez 10 minut pozwalano na swobodną eksplorację obu obiektów. Następnie, w fazie testu właściwego, który miał miejsce po upływie 24 godzin od treningu, myszy kolejny raz umieszczano w tym samym aparacie, jednak w obecności obiektów A i B (obiekt A pozostawał niezmienny, natomiast obiektem B był szklany słoiczek z kolorowymi kulkami w środku – pod względem faktury, koloru i kształtu różniący się od obiektu A, jednak porównywalnie interesujący dla badanych zwierząt; pozycja obiektów nie różniła się między fazą treningu a testem właściwym). Przez 10 minut zliczano czas poświęcony na eksplorację obu obiektów, przy czym za eksplorację uznawano każdą obecność zwierzęcia w strefie ≤ niż 2 cm odległości od obiektu pod warunkiem skierowania wzroku w stronę obiektu. Z analizy wykluczono myszy, które oba obiekty eksplorowały łącznie mniej niż 10 sekund. Dłuższa eksploracja nowego obiektu (B) oznacza lepszy indeks rozpoznania obiektu A, świadczący o sprawności pamięci długotrwałej. Indeks rozpoznania obliczano według formuły: indeks rozpoznania =

[czas eksploracji obiektu B / (czas eksploracji obiektu A + czas eksploracji obiektu B)]
x 100.

8. Pomiar zewnątrzkomórkowego poziomu monoamin w prążkowi

W dniu doświadczenia wejście kaniuli dializacyjnej łączono przy pomocy drenu teflonowego (FEP Tubing, Agnθος, Szwecja) ze strzykawką (1 ml) umieszczoną w pompie dializacyjnej (New Era Pump System, Inc., USA) podającej ze stałą prędkością (1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$) sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy w składzie (mM): NaCl 147, KCl 2,7, MgCl_2 1,0, CaCl_2 1,2; pH 7,4. W celu ustalenia stałego poziomu neuroprzekaźników kaniulę płukano przez 1 godzinę. Następnie pobierano w 20-minutowych odstępach 3 frakcje, aby określić podstawowy poziom neuroprzekaźników. W kolejnym etapie zwierzętom podano odpowiednie substancje (ip.) i pobieranie frakcji (także w 20-minutowych odstępach) kontynuowano przez 4 godziny. W trakcie doświadczenia myszy miały możliwość swobodnego poruszania się. Na końcu zwierzęta poddano eutanazji, a pobrane mózgi utrwalono w 4% roztworze formaldehydu w celu histologicznej weryfikacji miejsca implantacji kaniuli dializacyjnej.

W otrzymanych frakcjach dializatu przeanalizowano stężenia dopaminy i serotoniny za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *high performance liquid chromatography, HPLC*). W skład systemu HPLC Ultimate 3000 (Dionex, USA) wchodził detektor kulochemiczny (Coulochem II, model 5300, ESA, USA), celi ochronna (ang. *guard cell*) 5020 z komórką do mikrodializy 5014B oraz kolumna analityczna z fazą odwróconą Hypersil Gold-C18 (3 x 100 mm, Thermo, USA). Fazę ruchomą stanowił bufor o składzie 0,1 M fosforanu potasu (pH 3,6), 0,5 mM EDTA, 16 mg soli sodowej kwasu L-1 1-oktanosulfonowego i 2% metanolu. Szybkość przepływu przez kolumnę ustawiono na 0,7 ml/min. Zastosowany potencjał celi ochronnej wynosił +600 mV, natomiast celi do mikrodializy był następujący: E1 = -50 mV i E2 = +300 mV z czułością ustawioną na 50 nA/V-1. Dane chromatograficzne były przetwarzane przez oprogramowanie Chromeleon v. 6.80 (Dionex, USA). Wszystkie uzyskane dane z mikrodializy przedstawiono jako procent poziomu podstawowego znormalizowanego do 100%.

9. Badanie powinowactwa do receptorów opioidowych

Komórki CHO-K1 ze stabilną ekspresją ludzkich receptorów opioidowych μ (#ES-542-C, PerkinElmer), δ (#95-0108C2, eurofins) oraz κ (#ES-541-C, PerkinElmer) hodowano w suplementowanej pożywce DMEM (ang. *Dulbecco Modified Eagle Medium*) z dodatkiem 10% dializowanej płodowej surowicy bydlęcej (ang. *Foetal Bovine Serum, FBS*) i 500 $\mu\text{g/ml}$ antybiotyku genetycyny (G418) w 37°C w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO_2 . W celu przygotowania membran wykorzystywanych do badania powinowactwa *in vitro* metodą liganda znakowanego izotopowo, komórki rozsiewano na butelkach o powierzchni 150 cm^2 i hodowano do momentu osiągnięcia 90% konfluencji. Następnie komórki dwukrotnie przemywano buforem PBS, wstępnie ogrzanym do temperatury 37°C i wirowano (200 x g) przez 5 minut w tym samym buforze z dodatkiem 0,1 mM kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) i 1 mM ditiotretolu (DTT). Po odwirowaniu, osady membran zamrożono i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych oznaczeń.

Zamrożone osady komórek CHO-K1 ze stabilną ekspresją receptorów μ , δ i κ , homogenizowano (Ultra Turrax tissue) w objętości 10 ml buforu do eksperymentu kompetycji, a następnie dwukrotnie wirowano przez 20 min w 4°C (35 000 x g). Odwirowany materiał zawieszano w suplementowanym buforze Tris-HCl zawierającym 50 mM Tris HCl (pH 7,4) oraz 5 mM MgCl_2 . Próbki o pojemności 200 μl zawierające radioligand, badany związek oraz membrany, inkubowano do momentu osiągnięcia stanu równowagi (inkubacja przez 60 minut w 27°C), po tym czasie, kilkakrotnie przesączano i przemywano zimnym (4°C) buforem Tris-HCl na płytce UniFilter (GF/B), przy pomocy urządzenia Unifilter Harvester (PerkinElmer). Radioaktywność zatrzymaną na filtrze oznaczono ilościowo na czytniku mikroplętek Microbeta (PerkinElmer). Eksperymenty kompetycji były wykonane w obecności radioligandów: 4 nM [3H]-enkefalin (δ), 2 nM [3H]-U-69593 (κ) oraz 2 nM [3H]-DAMGO (μ). W celu wyznaczenia wiązania niespecyficznego próbki zawierały 10 μM BW373U86 (δ), U-50488 (κ) oraz DAMGO (μ). Każdy związek był testowany w 7 stężeniach (10^{-10} – 10^{-4} M). Stała inhibicji (K_i) została obliczona z równania Yung-Chi

i Prusoffa (1973). Wyniki zostały przedstawione jako średnie z przynajmniej dwóch odrębnych eksperymentów.

10. Pomiar aktywacji białka G (wiązanie [³⁵S]GTPγS)

Do pomiarów użyto homogenatów błon komórkowych pobranych uprzednio z mózgow samców szczurów Wistar w laboratorium Szeged Biological Research Centre (Szeged, Węgry). Błony przygotowano zgodnie z protokołem opisanym przez Benyhe i in. (1997). Mózgi zostały zhomogenizowane, a następnie odwirowano je w lodowatym 50 mM buforze Tris-HCl (pH 7,4; Sigma-Aldrich, Węgry) i inkubowano w 37°C przez 30 minut z wytrząsaniem w łaźni wodnej. Po inkubacji wirowanie powtórzono, a końcowy osad zawieszono w 50 mM buforu Tris-HCl (pH 7,4) zawierającym 0,32 M sacharozy i przechowywano w -80°C.

Eksperymenty funkcjonalnego wiązania [³⁵S]GTPγS przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisaną procedurą (Traynor i Nahorski, 1995), wprowadzając niewielkie modyfikacje. Homogenaty błon mózgowych szczura zawierające ~ białko inkubowano w temperaturze 30°C przez 60 minut w buforze Tris-EGTA (pH 7,4), składającym się z 50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 3 mM chlorku magnezu i 100 mM chlorku sodu. Mieszanina inkubacyjna zawierała ponadto 0,05 nM [³⁵S]GTPγS, rosnące stężenia (0,1 nM-10 μM) PZM21 i DAMGO oraz GDP (30 μM). Końcowa objętość mieszaniny inkubacyjnej wynosiła 1 ml. Całkowite wiązanie mierzono pod nieobecność badanych związków, podczas gdy wiązanie niespecyficzne oznaczano w obecności 10 μM nieznakowanego GTPγS. Związany i niezwiązany [³⁵S]GTPγS oddzielono przez szybką filtrację pod próżnią (Brandel M24R Cell Harvester) i przemyto trzykrotnie 5 ml lodowatego 50 mM Tris-HCl przez włókna szklane Whatman GF/B (GE Healthcare Life Sciences, Izinta Kft., Węgry). Następnie wykrywano radioaktywność filtrów. Eksperymenty wiązania [³⁵S]GTPγS przeprowadzono trzykrotnie w dwóch powtórzeniach. Krzywą wiązania w schemacie dawka-odpowiedź wyznaczono za pomocą regresji nieliniowej. Dane przedstawiono jako procent podstawowego poziomu aktywności znormalizowanego do 100%.

11. Analiza danych

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Graph-Pad Prism (8.0). Wybór testów statystycznych uzależniono od schematów doświadczalnych. Znamienność statystyczna została zbadana przez test t-Studenta dla prób niezależnych oraz jedno- dwu- lub trzyczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Kiedy było to zasadne, przeprowadzano testy post-hoc, domyślnie wybierane przez program statystyczny jako najbardziej odpowiednie. W przypadku braku możliwości przeprowadzenia analizy wariancji (brak wariancji w jednej z grup), przeprowadzono nieparametryczny test Kruskala-Wallisa. Za próg istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$.

Kryteria wykluczenia zwierząt z eksperymentów/analizy wyników uwzględniały niespełnienie warunków testów (zawyżoną wyjściową wrażliwość na bodziec nocyceptywny (powyżej 6 sekund w teście odsuwania ogona), wyjściowa preferencja wybranego kompartymentu podczas pretestu w teście warunkowanej preferencji miejsca, eksploracja obiektów wynosząca poniżej 10 sekund w teście rozpoznawania nowego obiektu). W przypadku wątpliwości co do występowania obserwacji odstających stosowano odpowiedni test statystyczny (test Grubbsa). Kilka zwierząt wykluczono z powodów związanych z problemami technicznymi (nieprawidłowym działaniem sprzętu, zatkaniem kateterów).

Wyniki

Prezentowane wyniki zostały częściowo opublikowane w poniższych pracach naukowych:

Kudła, Ł., Bugno, R., Skupio, U., Wiktorowska, Ł., Solecki, W., Wojtas, A., Gołombiowska, K., Zádor, F., Benyhe, S., Buda, Sz., Makuch, W., Przewłocka, B., Bojarski, A. J. i Przewłocki, R. (2019). Functional characterization of a novel opioid, PZM21, and its effects on the behavioural responses to morphine. *British Journal of Pharmacology*, 176(23), 4434-4445.

Kudła, Ł., Bugno, R., Podlewska, S., Szumiec, Ł., Wiktorowska, Ł., Bojarski, A. J. i Przewłocki, R. (2022). Comparison of an Addictive Potential of μ -Opioid Receptor Agonists with G Protein Bias: Behavioral and Molecular Modeling Studies. *Pharmaceutics*, 14(1), 55.

1. Antynocyceptywne efekty PZM21, SR-14968 oraz SR-17018

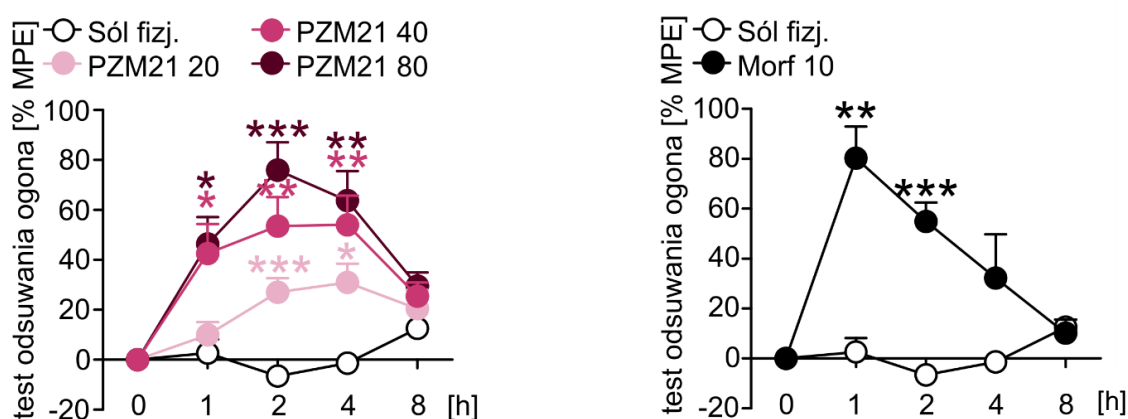
PZM21

Wpływ PZM21 na wrażliwość na termiczny bodziec bólowy zbadany został przy użyciu dwóch testów: odsuwania ogona oraz gorącej płytki (u myszy C57BL/6J, podanie ip.) Ponadto, antynocycepcja wywołana przez PZM21 zbadana została po nardzeniowym (ith.) podaniu u szczurów Wistar. Motywowane było to faktem, że autorzy oryginalnej publikacji opisującej odkrycie tego związku sugerowali, iż PZM21 osłabia jedynie aspekty bólu mediowane przez wyższe struktury mózgowie, a nie ma wpływu na odruchy rdzeniowe (Manglik i in., 2016). Dzięki podaniu ith. możliwy był pomiar działania PZM21 na poziomie rdzenia kręgowego. Ponadto antynocyceptywną skuteczność PZM21 oceniono także w warunkach eksperymentalnych, w których podanie tego związku poprzedzono podaniem cyprodime, który jest selektywnym antagonistą receptora μ , celem zweryfikowania czy obserwowane efekty są mediowane przez ten receptor.

Wrażliwość na termiczny bodziec bólowy w teście odsuwania ogona

PZM21 podano myszom w 3 dawkach: 20, 40 i 80 mg/kg. Dodatkowe grupy zwierząt otrzymały sól fizjologiczną (10ml/kg, kontrola negatywna) lub morfinę

w dawce 10 mg/kg (kontrola pozytywna). Pomiary wykonano 1, 2, 4 oraz 8 godzin po podaniu związków. Dwuczynnikowa ANOVA z powtarzаныmi pomiarami wykazała istotny efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(16,144)}=7,656$, $p<0,0001$, **Rycina 5**). Dane wskazują zatem na długotrwałe (utrzymujące się minimum 4 godziny) oraz zależne od dawki osłabienie wrażliwości na bodziec bólowy po podaniu PZM21. W tym układzie doświadczalnym morfina także wywoływała antynocycepcję, jednak miała ona inną dynamikę – jej szczyt wystąpił 1 godzinę po podaniu, natomiast w przypadku PZM21 efekt narastał wolniej i był najwyższy 2 godziny po podaniu.



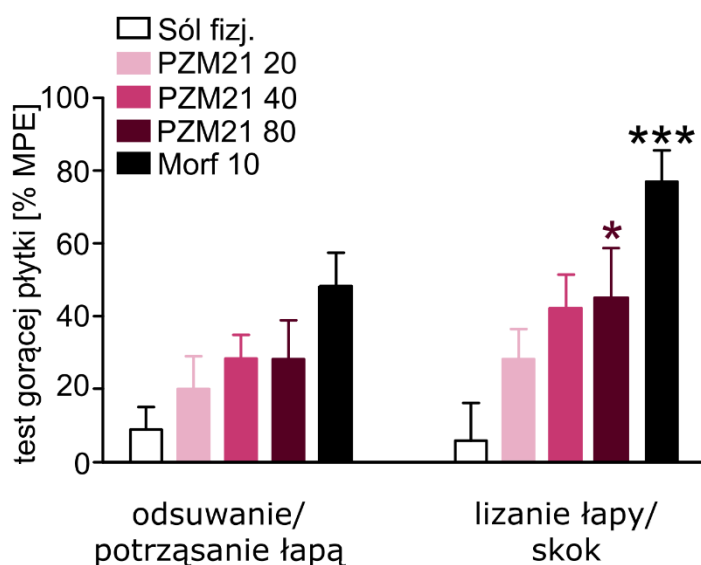
Rycina 5. Antynocyceptywny efekt PZM21 w teście odsuwania ogona.

Podanie PZM21 (20-80 mg/kg, ip.) wywołało zależną od dawki antynocycepcję w teście odsuwania ogona. Efekt morfiny (Morf) podanej w dawce 10 mg/kg, ip., użytej jako pozytywna kontrola, przedstawiony jest na wykresie po prawej stronie. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ (test Dunnetta, kolory symboli odpowiadają kolorom, którymi oznaczono grupy). Wszystkie dawki PZM21 oraz morfina porównane zostały do tej samej grupy kontrolnej, tj. otrzymującej sól fizjologiczną.

Wrażliwość na termiczny bodziec bólowy w teście gorącej płytki

W teście gorącej płytki mierzono latencję 2 typów reakcji: odsuwanie/potrząsanie łapą oraz lizanie łapy/skok, zgodnie z metodą opisaną przez Manglika i in. (2016). Zastosowano te same grupy badawcze, jak w przypadku testu odsuwania ogona, ale z uwagi na to, że w teście gorącej płytki występują procesy związane z uczeniem się, które mogą wpływać na otrzymywany wynik, pomiar wykonywano jedynie 90 minut po podaniu substancji. Otrzymane dane wykazały, że żadna z dawek PZM21 ani morfina nie wpłynęły istotnie na latencję reakcji odsuwania/potrząsania łapą (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,42)}=2,560$, $p=0,0524$). Można zaobserwować zależne od dawki nasilenie antynocycepcji w grupach traktowanych PZM21, jednak najwyższy efekt uzyskano u myszy, które otrzymały

podanie morfiny. Odrębną analizę przeprowadzono dla reakcji lizania łapy/skoku (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,42)}=5,634$, $p=0,0010$). Wykazała ona zależność od dawki antynocycepcję osiągającą istotność statystyczną dla dawki 80 mg/kg PZM21 oraz morfiny w dawce 10 mg/kg. Wyniki przedstawiono na **Rycinie 6**.

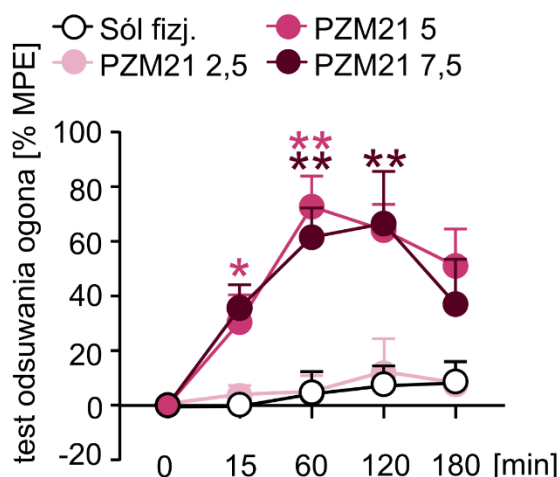


Rycina 6. Antynocyceptywny efekt PZM21 w teście gorącej płytki.

Podanie PZM21 (20-80 mg/kg, ip.) oraz morfiny (Morf; 10 mg/kg, ip.) nie wpłynęło istotnie na antynocycepcję określaną jako latencja reakcji odsuwania/potrząsania łapą. Efekt antynocyceptywny zaobserwowano natomiast w przypadku reakcji lizania łapy/skoku. Była ona istotna statystycznie dla dawki 80 mg/kg PZM21 oraz 10 mg/kg morfiny. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, * $p<0,05$, *** $p<0,001$ (test Dunnetta). Wszystkie dawki PZM21 oraz morfina porównane zostały do grupy otrzymującej sól fizjologiczną.

Wrażliwość na termiczny bodziec bólowy w teście odsuwania ogona po podaniu nardzeniowym

Po pomiarze wyjściowej wrażliwości szczurów w teście odsuwania ogona, PZM21 (2,5, 5, 7,5 μ g) podano przez katetery umieszczone podpajęczynówkowo na poziomie L4-L6 rdzenia kręgowego. Pomiary wykonano 15, 60, 120 i 180 minut po podaniu. Dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami wykazała istotny efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(12,88)}=3,096$, $p=0,0011$, **Rycina 7**). Dane wskazują zatem, że PZM21 skutecznie osłabia wrażliwość zwierząt na bólowy bodziec termiczny poprzez mechanizmy rdzeniowe. Należy mieć jednak na uwadze, że nardzeniowa droga podania charakteryzuje się inną dynamiką wywoływanego efektu, ponieważ w tym przypadku antynocycepcja utrzymuje się do 2 godzin od podania.

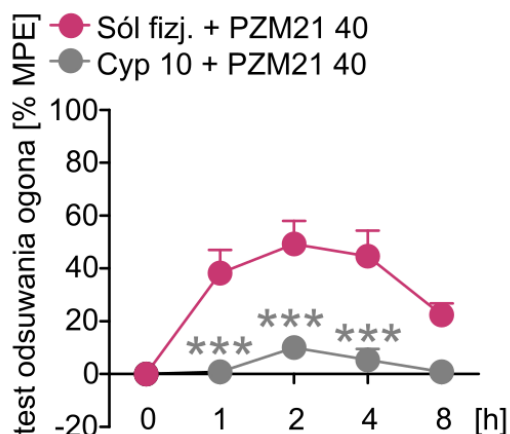


Rycina 7. Antynocyceptywne działanie PZM21 w teście odsuwania ogona po podaniu nardzeniowym.

Podanie PZM21 (2,5–7,5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$, *ith.*) wywołało zależną od dawki antynocycepcję w teście odsuwania ogona. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (test Dunnetta, kolory symboli odpowiadają kolorom, którymi oznaczono grupy). Efekty PZM21 oraz morfiny porównane zostały do grupy, która otrzymała sól fizjologiczną.

Wpływ blokady receptorów μ na antynocyceptywne działanie PZM21

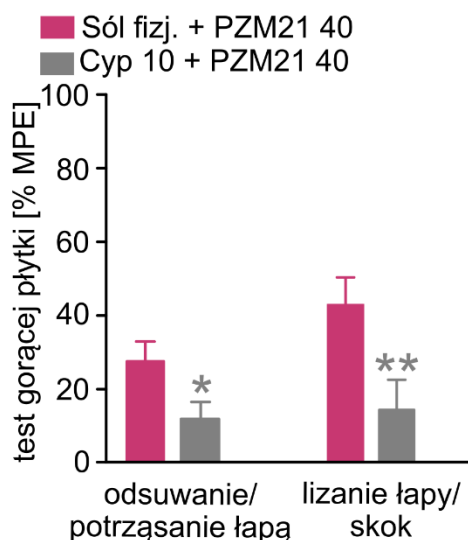
PZM21 został oryginalnie opisany jako agonista receptora μ (Manglik i in., 2016), dlatego też na ostatnim etapie tej części badań zbadano wpływ blokady receptorów μ przez selektywnego antagonistę tych receptorów, cyprodime, na antynocycepcję wywołaną przez podanie PZM21 w dawce 40 mg/kg (*ip.*) u myszy. Dawka agonisty została wybrana na podstawie testów odsuwania ogona i gorącej płytki, gdzie podanie 40 mg/kg związku wywoływało antynocycepcję na poziomie $\sim 50\%$ MPE. Dawka dwukrotnie wyższa (80 mg/kg) nie skutkowała osiągnięciem efektu maksymalnego (100% MPE), co sugeruje tzw. efekt sufitowy (lub pułapowy), który oznacza, że podnoszenie dawki powyżej pewnego poziomu nie jest związane z wyższą skutecznością agonisty. Cyprodime (10 mg/kg) lub sól fizjologiczną (10 ml/kg) podano *ip.*, 15 minut przed PZM21. W teście odsuwania ogona odnotowano istotny statystycznie efekt interakcji (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami: grupa \times czas: $F_{(4,72)}=7,652$, $p < 0,0001$), co wskazuje na zablokowanie wywołanej przez PZM21 antynocycepcji (**Rycina 8**).



Rycina 8. Wpływ cyprodime na antynocyceptywne działanie PZM21 w teście odsuwania ogona.

Podanie cyprodime (Cyp), selektywnego antagonisty receptora μ (10 mg/kg, *ip.*), 15 minut przed podaniem PZM21 (40 mg/kg, *ip.*) zablokowało antynocycepcję wywołaną przez PZM21. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, *** $p < 0,001$ (test Sidaka).

Test gorącej płytki po podaniu cyprodime i PZM21 przeprowadzono analogicznie jak w przypadku pomiaru zależnej od dawki antynocycepcji wywołanej przez PZM21. Otrzymane dane wykazały, że podanie cyprodime zablokowało antynocyceptywny efekt PZM21 zarówno w pomiarze reakcji odsuwania/potrząsania łapą (test t-Studenta dla prób niezależnych, $t_{18}=2,496$, $p=0,0225$), jak też w przypadku reakcji lizania łapy/skoku (test t-Studenta dla prób niezależnych, $t_{18}=3,370$, $p=0,0034$), co przedstawia **Rycina 9**.



Rycina 9. Wpływ cyprodime na antynocyceptywne działanie PZM21 w teście gorącej płytki.

Podanie cyprodime (Cyp), selektywnego antagonisty receptora μ (10 mg/kg, ip.), 15 minut przed podaniem PZM21 (40 mg/kg, ip.) zablokowało antynocycepcję wywołaną przez PZM21 mierzoną za pomocą obserwacji dwóch typów reakcji. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ (test t-Studenta dla każdego typu reakcji).

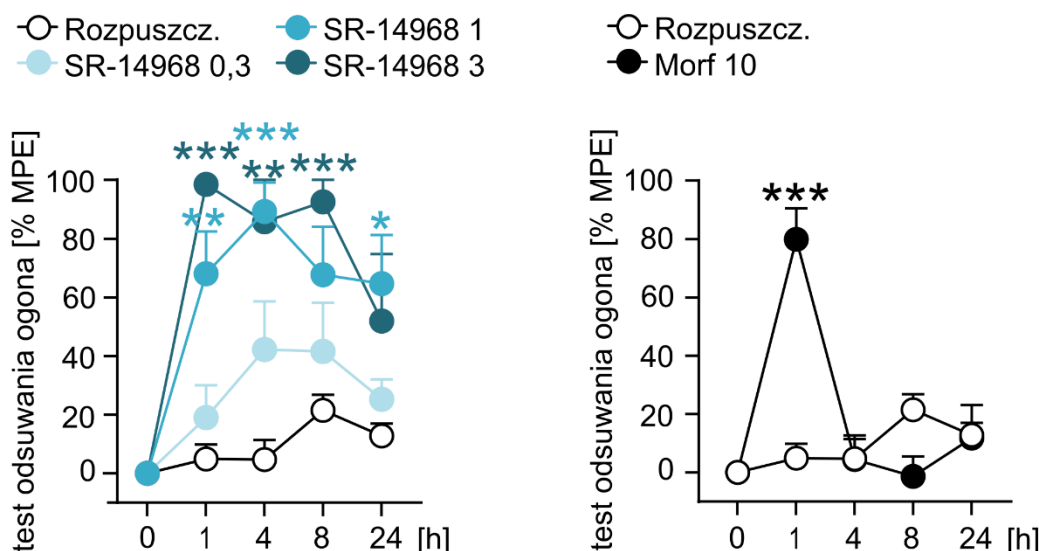
SR-14968

W przypadku SR-14968 wpływ tego agonisty na wrażliwość na termiczny bodziec nocyceptywny zbadany został u myszy C57BL/6J (podania ip.), przy użyciu testów odsuwania ogona oraz gorącej płytki. Doświadczenia przeprowadzono w sposób analogiczny jak w przypadku PZM21, ale z uwzględnieniem innych punktów pomiarowych w celu uchwycenia dynamiki działania agonisty.

Wrażliwość na termiczny bodziec bólowy w teście odsuwania ogona

SR-14968 został podany myszom w 3 dawkach: 0,3, 1 i 3 mg/kg, dodatkowe grupy zwierząt otrzymały podanie rozpuszczalnika (10 ml/kg, kontrola negatywna) oraz morfiny w dawce 10 mg/kg (kontrola pozytywna). Pomiary wykonano 1, 4, 8 oraz 24 godziny po podaniu związków. Dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami wykazała istotny statystycznie efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(16,168)}=5,695$, $p<0,0001$), co oznacza występowanie zależnego od dawki i czasu pomiaru efektu antynocycepcji po podaniu SR-14968. W porównaniu do morfiny,

przebieg antynocycepcji miał inną dynamikę – efekt utrzymywał się znacząco dłużej (nawet do 24 godzin). Wyniki prezentuje **Rycina 10**.

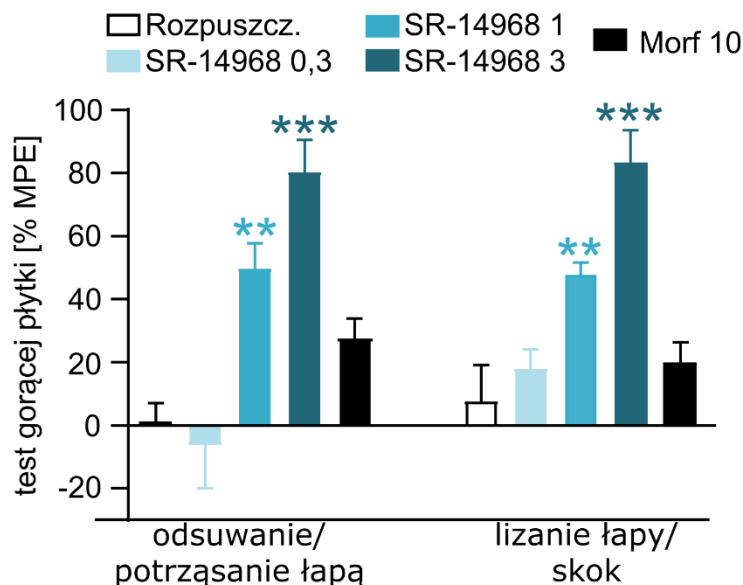


Rycina 10. Antynocyceptywne działanie SR-14968 w teście odsuwania ogona.

Podanie SR-14968 (0,3-3 mg/kg, ip.) wywołało zależną od dawki antynocycepcję w teście odsuwania ogona. Efekt morfiny (Morf) podanej w dawce 10 mg/kg, ip., użytej jako pozytywnej kontroli, przedstawiony jest na wykresie po prawej stronie. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (test Dunnetta, kolory symboli odpowiadają kolorom, którymi oznaczono grupy). Wszystkie dawki SR-14968 oraz morfina porównane zostały do tej samej grupy kontrolnej, tj. otrzymującej rozpuszczalnik użyty do przygotowania roztworów SR-14968 i morfiny. Tych samych grup kontrolnych użyto w teście mierzącym efekty SR-17018, przedstawionym na Rycinie 12.

Wrażliwość na termiczny bodziec bólowy w teście gorącej płytki

Test gorącej płytki przeprowadzono 90 minut po podaniu substancji w tych samych dawkach, jak w przypadku testu odsuwania ogona. Analiza otrzymanych danych wykazała, że SR-14968 wywołuje antynocycepcję definiowaną przez wzrost latencji reakcji odsuwania/potrząsania łapą (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,42)}=12,33$, $p < 0,0001$). Antynocycepcję wykazano także w pomiarze reakcji lizania łapy/skoju (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,42)}=11,85$, $p < 0,0001$). Analiza post-hoc wskazała, że w przypadku obu reakcji efekt antynocycepcji osiągnął poziom istotności statystycznej dla dawek 1 i 3 mg/kg SR-14968. W tych warunkach doświadczalnych nie wykazano antynocyceptywnej skuteczności morfiny. Wyniki testu przedstawia **Rycina 11**.



Rycina 11. Antynocyceptywne działanie SR-14968 w teście gorącej płytki.

Podanie SR-14968 (0,3-3 mg/kg, ip.) w sposób zależny od dawki wywołało antynocycepcję w pomiarze reakcji odsuwania/potrząsania łapą. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku reakcji lizania łapy/skoku. Nie odnotowano natomiast istotnej statystycznie antynocycepcji wynikającej z podania morfiny (Morf; 10 mg/kg, ip.). Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (test Dunnetta). Wszystkie dawki SR-14968 oraz morfina porównane zostały do grupy otrzymującej rozpuszczalnik użyty do przygotowania roztworów. Tych samych grup kontrolnych użyto w teście mierzącym efekty SR-17018, przedstawionym na Rycinie 13.

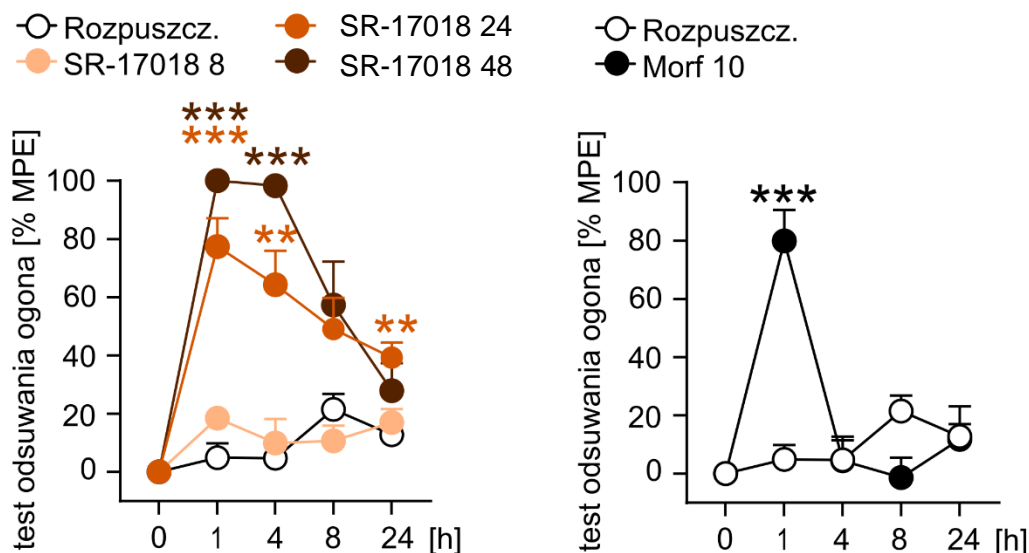
SR-17018

Antynocyceptywne działanie SR-17018 zbadano analogicznie jak efekty SR-14968. Wykorzystano testy odsuwania ogona i gorącej płytki, które przeprowadzono u myszy C57BL/6J (podania ip.).

Wrażliwość na termiczny bodziec bólowy w teście odsuwania ogona

Efekty SR-17018 zostały przebadane w tym samym schemacie jak w przypadku SR-14968, jednak zastosowano dawki 8, 24 i 48 mg/kg. Wyniki otrzymane w teście odsuwania ogona również wykazały zależność od dawki i czasu pomiaru antynocycepcję wywołaną przez tego agonistę (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami: efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(16,176)}=12,20$, $p < 0,0001$)). Podobnie jak w przypadku SR-14968 efekt był długotrwały, utrzymywał się nawet powyżej 24 godz. (Rycina 12).

Wyniki

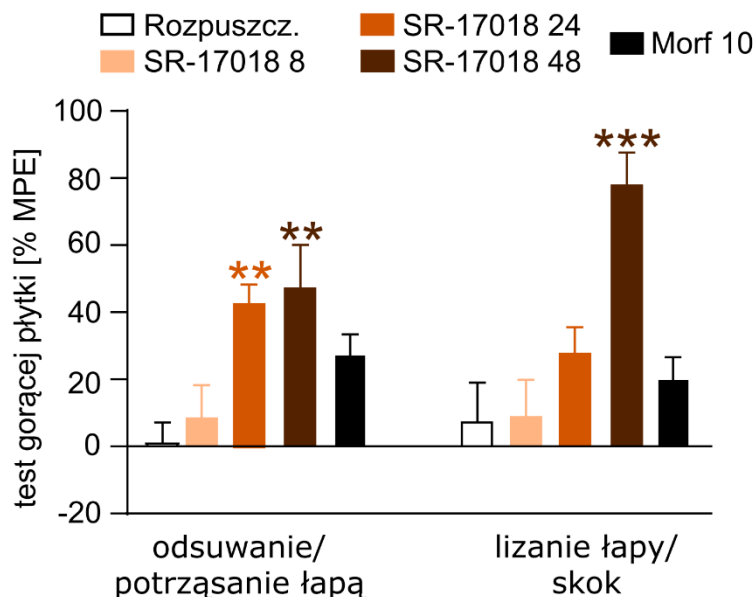


Rycina 12. Antynocyceptywne działanie SR-17018 w teście odsuwania ogona.

Podanie SR-17018 (8-24 mg/kg, ip.) wywołało zależną od dawki antynocycepcję w teście odsuwania ogona. Efekt podania morfiny (Morf; 10 mg/kg, ip.), użytej w roli pozytywnej kontroli, przedstawiono na wykresie po prawej stronie. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (test Dunnetta, kolory symboli odpowiadają kolorom, którymi oznaczono grupy). Wszystkie dawki SR-17018 oraz morfina porównane zostały do tej samej grupy kontrolnej, tj. otrzymującej rozpuszczalnik użyty do przygotowania roztworów SR-17018 i morfiny. Tych samych grup kontrolnych użyto w teście mierzącym efekty SR-14968, którego wyniki przedstawia Rycina 10.

Wrażliwość na termiczny bodziec bólowy w teście gorącej płytki

Antynocyceptywny efekt SR-17018 zaobserwowano także w teście gorącej płytki. Analiza statystyczna wykazała wywołany przez SR-17018 wzrost latencji reakcji odsuwania/potrząsania łapą (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,44)}=5,318$, $p=0,0014$), a także reakcji lizania łapy/skoku (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,44)}=9,312$, $p < 0,0001$). Testy post-hoc wykazały, że w przypadku pierwszego typu reakcji efekt był statystycznie istotny dla dawek 24 i 48 mg/kg oraz jedynie dla dawki 48 mg/kg w przypadku reakcji drugiego typu. Nie zaobserwowano statystycznie istotnego efektu działania morfiny. Wyniki przedstawiono na **Rycinie 13**.



Rycina 13. Antynocyceptywne działanie SR-17018 w teście gorącej płytki.

Podanie SR-17018 (8-24 mg/kg, ip.) w sposób zależny od dawki wywołało antynocycepcję w pomiarze reakcji odsuwania/potrząsania łapą. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku reakcji lizania łapy/skoku. Nie odnotowano natomiast istotnej statystycznie antynocycepcji wynikającej z podania morfiny (Morf; 10 mg/kg, ip.). Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (test Dunnetta). Wszystkie dawki SR-17018 oraz morfina porównane zostały do grupy otrzymującej rozpuszczalnik użyty do przygotowania roztworów. Tych samych grup kontrolnych użyto w teście mierzącym efekty SR-14968, którego wyniki przedstawia Rycina 11.

Podsumowanie – dawki ED_{50} badanych agonistów

PZM21, SR-14968 i SR-17018 wywoływały zależną od dawki, długotrwałą antynocycepcję. Na podstawie danych otrzymanych w teście odsuwania ogona obliczono wysokość dawki ED_{50} . Wyniki obliczeń przedstawia **Tabela 5**.

Tabela 5. Dawki ED_{50} badanych agonistów.

	PZM21*	SR-14968**	SR-17018**
ED_{50} (CL 95%)	37,37	0,61	14,13
	(31,62 \pm 44,18)	(0,53 \pm 0,7)	(12,6 \pm 15,8)

Obliczenia przeprowadzono na podstawie danych uzyskanych w teście odsuwania ogona po podaniu substancji ip. w punkcie czasowym, w którym antynocyceptywny efekt agonisty był najwyższy. * 1 godzina po podaniu, ** 2 godziny po podaniu

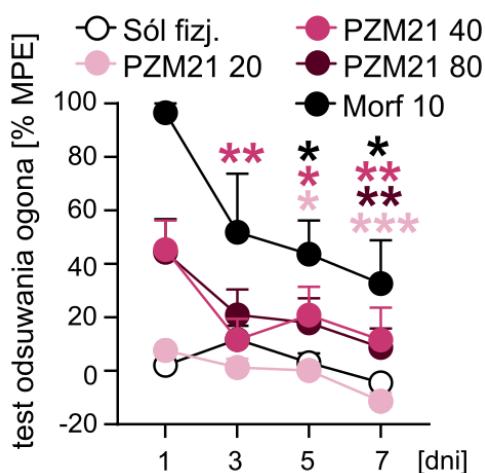
2. Potencjał uzależniający PZM21, SR-14968 i SR-17018

PZM21

Uzależniający potencjał PZM21 został przebadany z uwzględnieniem wpływu tego agonisty na rozwój tolerancji na działanie antynocyceptywne i zależności fizycznej przejawiającej się zespołem odstawienia, a także efektów lokomotorycznych tego związku, właściwości nagradzających i wzmacniających.

Tolerancja na działanie antynocyceptywne

Tolerancja na działanie antynocyceptywne w trakcie wielokrotnych podań PZM21 została zbadana przy użyciu testu odsuwania ogona. Zwierzętom podawano ip. PZM21 (20, 40, 80 mg/kg), morfinę (10 mg/kg) lub sól fizjologiczną (10 ml/kg) przez 7 kolejnych dni. Pomiar wrażliwości na bodziec bólowy przeprowadzono w 1, 3, 5 oraz 7 dniu doświadczenia, 1 godzinę po podaniu substancji. Dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami wykazała istotny statystycznie efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(12,117)}=3,004$, $p=0,0011$), wskazując na rozwój tolerancji w przebiegu chronicznych podań substancji. Tolerancja na antynocycepcję w grupie myszy otrzymujących PZM21 w dawce 40 mg/kg osiągnęła znamienność statystyczną już w 3 dniu podań, efekt pogłębiał się wraz z upływem czasu i w 7 dniu eksperymentu był istotny dla wszystkich grup eksperymentalnych (**Rycina 14**).



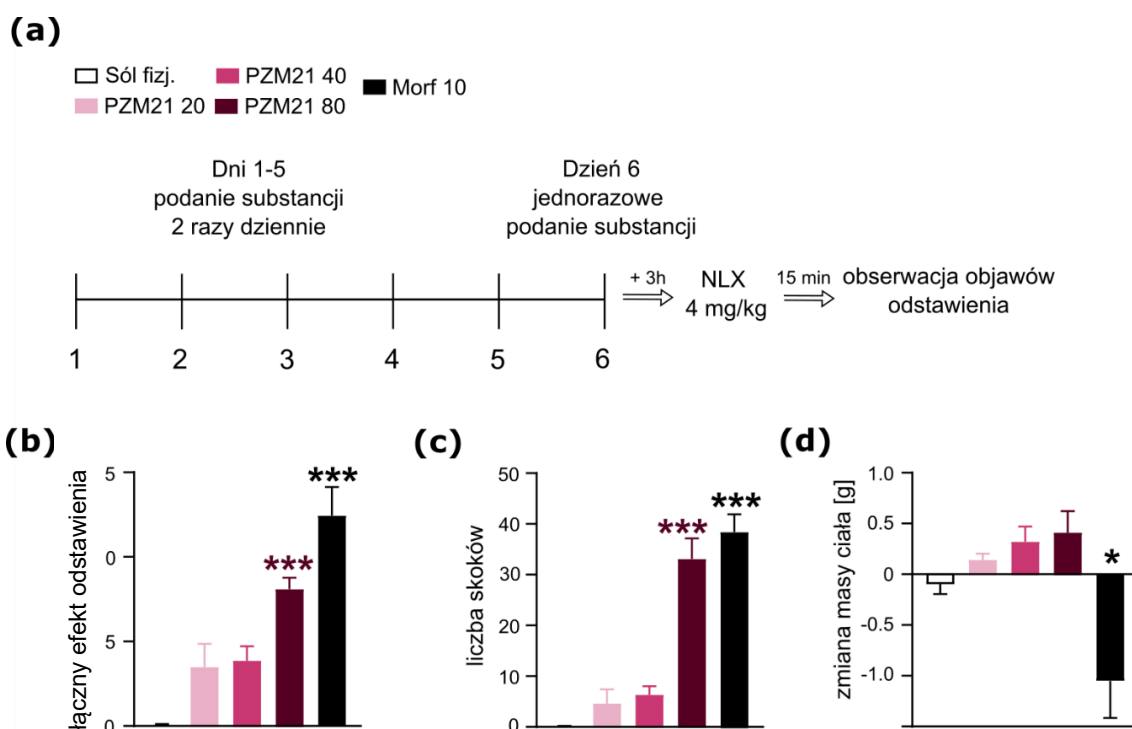
Rycina 14. Tolerancja na antynocyceptywne działanie PZM21.

Wielokrotne (1 raz dziennie przez 7 dni) podania PZM21 (20-80 mg/kg, ip.) oraz morfiny (Morf; 10 mg/kg, ip.) skutkowały rozwojem tolerancji na wywoływaną przez tych agonistów antynocycepcję, którą mierzono za pomocą testu odsuwania ogona, 1 godzinę po podaniu substancji. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ (test Dunnetta, kolory symboli odpowiadają kolorom, którymi oznaczono grupy). Analizę statystyczną przeprowadzono porównując zmianę efektu wewnątrz każdej grupy względem pierwszego dnia doświadczenia.

Zależność fizyczna i zespół odstawienia precypitowany naloksonem

Zależność fizyczna od PZM21 została zmierzona za pomocą obserwacji objawów odstawienia precypitowanego podaniem naloksonu (4 mg/kg, ip.) u myszy,

którym uprzednio wielokrotnie podawano ip. PZM21 (20, 40, 80 mg/kg), morfinę (10 mg/kg) lub sól fizjologiczną (10 ml/kg). Schemat doświadczenia przedstawia **Rycina 15a**. Obserwacja objawów odstawienia wykazała istotny statystycznie wzrost symptomów świadczących o zespole odstawienia w grupie myszy chronicznie otrzymujących PZM21 w dawce 80 mg/kg lub morfinę (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,51)}=15,33$, $p<0,0001$, **Rycina 15b**). Te same grupy zwierząt prezentowały także znamienne statystycznie wzrost liczby skoków, uważanych za najbardziej typowy objaw odstawienia u myszy (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,51)}=35,98$, $p<0,0001$, **Rycina 15c**). Przeanalizowano także zmiany masy ciała wewnątrz każdej z grup doświadczalnych w celu oceny wpływu chronicznych podań substancji na ogólny stan zdrowia zwierząt. Istotny statystycznie spadek masy ciała odnotowano jedynie w grupie zwierząt chronicznie traktowanych morfiną (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,51)}=6,212$, $p=0,0004$, **Rycina 15d**).



Rycina 15. Zależność fizyczna i zespół odstawienia precypitowanego naloksonem po chronicznych podaniach PZM21.

(a) Mysiom wielokrotnie podawano (ip.) PZM21 (20-80 mg/kg), morfinę (Morf; 10 mg/kg) lub sól fizjologiczną zgodnie z przedstawionym schematem. Po precypitacji odstawienia przez podanie naloksonu (NLX, 4 mg/kg, ip.) zaobserwowano **(b)** wzrost łącznego efektu odstawienia oraz **(c)** wzrost liczby skoków u myszy z grup otrzymujących PZM21 w dawce 80 mg/kg lub morfinę. **(d)** Jedynie u myszy z grupy otrzymującej morfinę odnotowano spadek masy ciała. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, * $p<0,05$, *** $p<0,001$ (test Dunnetta). Grupy otrzymujące PZM21 lub morfinę porównano do myszy, którym podawano sól fizjologiczną.

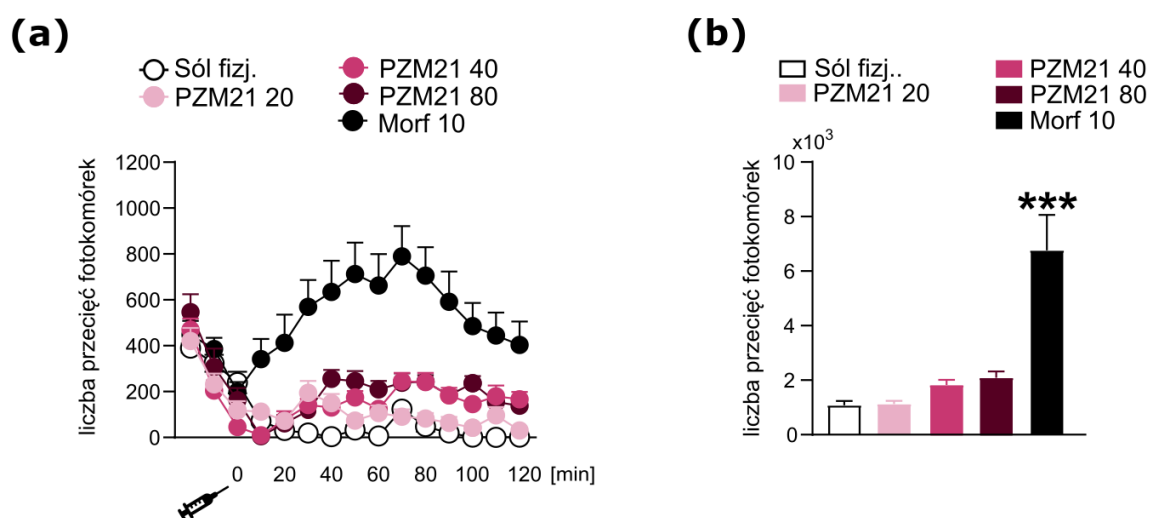
Aktywność lokomotoryczna po jednorazowych i wielokrotnych podaniach

Nasilenie aktywności lokomotorycznej i sensytyzacja lokomotoryczna są typowymi efektami podań agonistów receptora μ u myszy szczepu C57BL/6J, które związane są z uzależniającymi właściwościami tych agonistów. Dlatego w kolejnym etapie zbadano efekty podań PZM21 (20, 40 i 80 mg/kg) oraz morfiny (10 mg/kg) i soli fizjologicznej (10ml/kg) na aktywność lokomotoryczną myszy, a także potencjalną sensytyzację tego efektu i jego ekspresję po okresie inkubacji.

Na początku aktywność lokomotoryczną zwierząt zmierzono po jednorazowym podaniu wszystkich substancji. Podania substancji - PZM21, morfiny i soli fizjologicznej poprzedzono adaptacją myszy do klatek wyposażonych w fotokomórkę mierzące ich aktywność. Następnie zwierzęta otrzymywały podania odpowiednich substancji, a pomiar aktywności trwał kolejne 2 godziny. Wyniki tego etapu doświadczenia przedstawiono na **Rycinie 16**. W celu zobrazowania przebiegu aktywności lokomotorycznej dane przedstawiono w sposób poglądowy prezentując je w 10-minutowych odstępach czasowych. Dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami wykazała istotny statystycznie efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(44,462)}=4,448$, $p<0,0001$), wskazując na występowanie międzygrupowych różnic w zakresie poziomu aktywności lokomotorycznej w różnych punktach czasowych (**Rycina 16a**). Sumaryczny wskaźnik aktywności lokomotorycznej zwierząt w ciągu 2 godzin także wskazał istotne różnice w aktywności zwierząt (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,42)}=16,50$, $p<0,0001$, **Rycina 16b**), jednak analiza post-hoc wykazała, że w odróżnieniu od morfiny, żadna z badanych dawek PZM21 nie wpłynęła na nasilenie aktywności lokomotorycznej myszy względem grupy kontrolnej.

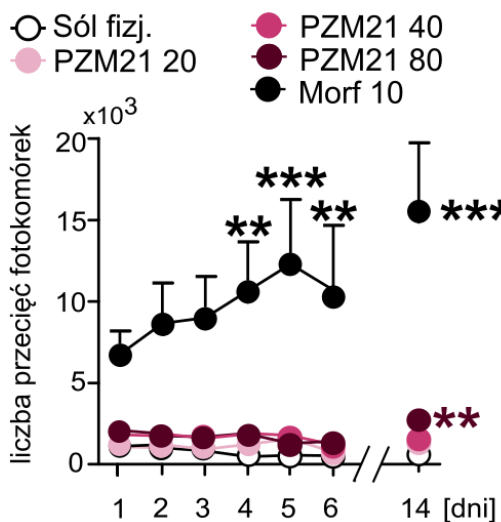
Ten sam schemat doświadczenia kontynuowano przez kolejne dni, aby zaobserwować efekty badanych substancji podczas podań wielokrotnych. Analiza danych (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami) wykazała istotny statystycznie efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(24,252)}=4,298$, $p<0,0001$), co świadczy o zależnych od czasu zmianach w aktywności lokomotorycznej badanych grup (**Rycina 17**). Analiza post-hoc pozwala jednak stwierdzić, że istotny statystycznie wzrost aktywności lokomotorycznej w trakcie eksperymentu dotyczy jedynie grupy otrzymującej morfinę. Po upływie kolejnych 8 dni, podczas których zwierzęta nie otrzymywały żadnych substancji (okres inkubacji), przeprowadzono pomiar

ekspresji sensytyzacji po ponownym podaniu związków. Uzyskane wyniki wskazują, że efekt jest znamieny dla myszy z grup otrzymujących PZM21 w dawce 80 mg/kg i morfinę (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzаныmi pomiarami: efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(4,42)}=30,16$, $p<0,0001$)). Dane uzyskane w eksperymencie wskazują zatem, że w odróżnieniu od efektów morfiny, jednorazowe podanie PZM21 nie nasila istotnie aktywności lokomotorycznej zwierząt, a wielokrotne podania agonisty nie powodują rozwoju sensytyzacji lokomotorycznej. Najwyższa dawka PZM21 użyta w badaniach wywołuje natomiast nasiloną ekspresję aktywności po okresie inkubacji.



Rycina 16. Aktywność lokomotoryczna po jednorazowym podaniu PZM21.

(a) Zwierzęta przez 30 minut adaptowano do klatek, a następnie podano im substancje (ip.): PZM21 (20-80 mg/kg), morfinę (Morf; 10 mg/kg) lub sól fizjologiczną, po czym aktywność mierzono przez kolejne 2 godziny w 10-minutowych odstępach. **(b)** Całkowita aktywność lokomotoryczna myszy w ciągu 2 godzin była nasiloną w sposób istotny statystycznie jedynie w grupie zwierząt, które otrzymały morfinę. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, *** $p<0,001$ (test Holma-Sidaka, porównanie do grupy myszy, którym podano sól fizjologiczną). Dla przejrzystości prezentowanych danych nie oznaczono istotności efektów na wykresie przedstawiającym przebieg czasowy aktywności lokomotorycznej badanych grup.

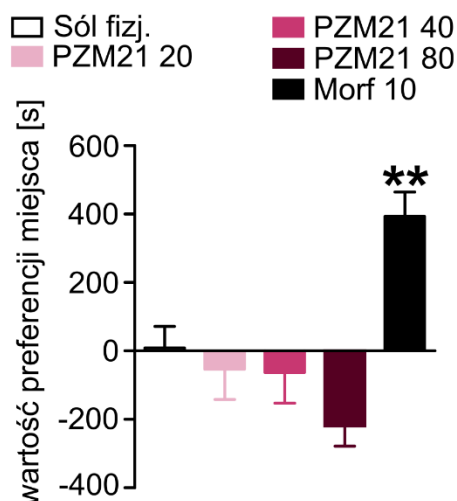


Rycina 17. Aktywność lokomotoryczna w przebiegu wielokrotnych podań PZM21.

Zwierzęta otrzymywały podania (ip.) PZM21 (20-80 mg/kg), morfiny (Morf; 10 mg/kg) lub soli fizjologicznej, po czym ich aktywność mierzono przez 2 godziny przez 6 kolejnych dni oraz dodatkowo po 8-dniowym okresie inkubacji. Jedynie u myszy otrzymujących morfinę rozwinęła się sensytyzacja lokomotoryczna. Ekspresja sensytyzacji po okresie inkubacji była znamienne dla grup, którym podawano morfinę oraz PZM21 w dawce 80 mg/kg. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (test Sidaka, kolory symboli odpowiadają kolorom, którymi oznaczono grupy). Analizę statystyczną przeprowadzono porównując zmianę efektu wewnątrz każdej grupy względem pierwszego dnia doświadczenia (do dnia 6), natomiast ekspresję sensytyzacji obliczono porównując aktywność wewnątrz każdej grupy z dnia 6 do dnia 14.

Warunkowana preferencja miejsca

Do oceny nagradzającego potencjału PZM21 wykorzystano paradygmat warunkowanej preferencji miejsca, w którym zbadano wpływ podań ip. PZM21 (20, 40 i 80 mg/kg), morfiny (10 mg/kg) i soli fizjologicznej (10 ml/kg) na powstanie preferencji do kontekstu skojarzonego z podaniem substancji potencjalnie nagradzającej. Otrzymane dane wykazały, że jedynie myszy z grupy otrzymującej morfinę wykształciły preferencję względem kontekstu skojarzonego z jej podaniami (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,45)}=9,159$, $p < 0,0001$, **Rycina 18**). Zgodnie z analizą post-hoc, żadna z dawek PZM21 nie wywołała preferencji miejsca u myszy. Najwyższa badana dawka PZM21 wykazuje natomiast słabe działanie awersyjne. Jest to efekt znamienno statystycznie w przypadku porównania efektów tej dawki do grupy otrzymującej sól fizjologiczną (test t-Studenta dla prób niezależnych, $t_{18}=2,626$, $p=0,0171$). Wyniki uzyskane w tym doświadczeniu wskazują zatem, że PZM21 nie ma działania nagradzającego, a w dawce 80 mg/kg może posiadać właściwości awersyjne.



Rycina 18. Działanie PZM21 w teście warunkowanej preferencji miejsca.

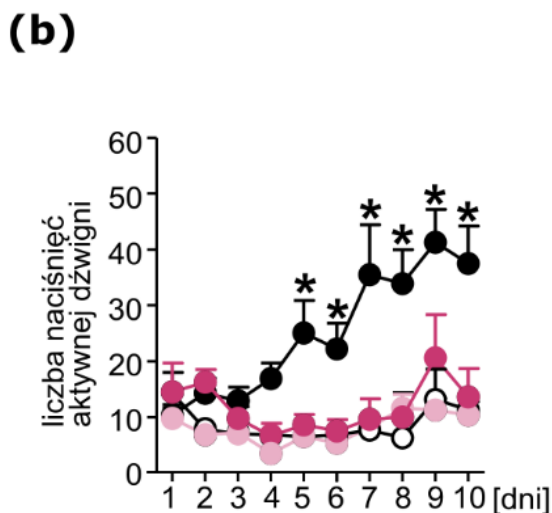
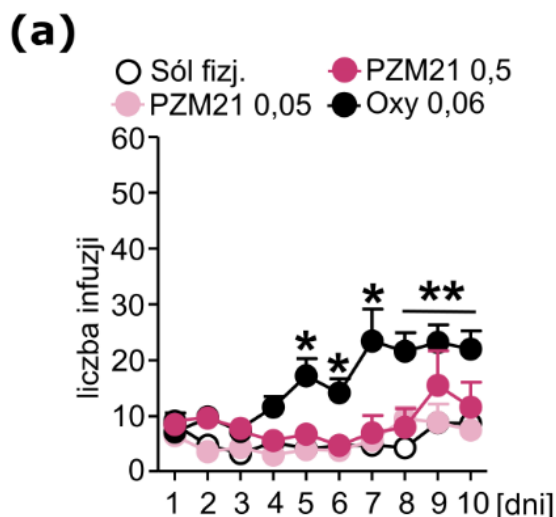
Myszy poddano procedurze warunkowanej preferencji miejsca, w której otrzymywały podania (ip.) PZM21 (20-80 mg/kg), morfiny (Morf; 10 mg/kg) lub soli fizjologicznej (podczas warunkowań kontrolnych wszystkie grupy otrzymywały podania soli fizjologicznej). Preferencja miejsca wykształciła się jedynie u myszy otrzymujących morfinę. PZM21 nie miał w tych warunkach działania nagradzającego. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, ** $p < 0,01$ (test Dunnetta). Wszystkie dawki PZM21 oraz morfina porównane zostały do grupy otrzymującej sól fizjologiczną.

Dożylne samopodawanie substancji i jej poszukiwanie w okresie abstynencji

Na kolejnym etapie badań uzależniającego potencjału PZM21 zbadano w modelu dożylnego samopodawania substancji. Umożliwiło to ocenę wpływu PZM21 na wywoływanie pozytywnego wzmocnienia, czyli typowego efektu substancji uzależniających. Szczury przez 10 kolejnych dni, podczas 2-godzinnych sesji w klatkach Skinnera, samopodawały sobie PZM21 (0,05 lub 0,5 mg/kg/infuzję), oksykodon (0,06 mg/kg/infuzję) lub sól fizjologiczną (0,0125 ml/infuzję). Jednorazowa infuzja substancji wymagała naciśnięcia aktywnej dźwigni, co wiązało się dodatkowo z prezentacją bodźców warunkowych (dźwięku i światła). Otrzymane dane wskazały, że wraz z upływem czasu, liczba infuzji na sesję rosła jedynie w grupie szczurów samopodających sobie oksykodon, natomiast u szczurów samopodających sobie PZM21 nie różniła się w sposób istotny statystycznie od zwierząt kontrolnych (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami: efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(27,279)}=2,697$, $p < 0,0001$, **Rycina 19a**). Innym wskaźnikiem rozwoju samopodawania jest postęp w zakresie dyskryminacji między dźwignią aktywną a nieaktywną – wzmacniające efekty substancji wiążą się ze wzrostem w czasie liczby naciśnień dźwigni aktywnej, ale nie nieaktywnej. Trójczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami wykazała istotny statystycznie efekt interakcji (grupa x czas x rodzaj dźwigni: $F_{(27,558)}=2,88$, $p < 0,0001$, **Rycina 19b i 19c**), jednak zgodnie z analizą post-hoc, jedynie szczury z grupy samopodającej sobie oksykodon, począwszy od dnia 5, istotnie częściej naciskały dźwignię aktywną niż nieaktywną. Opisane dane wskazują, że wzmacniające efekty na zachowanie zwierząt miał oksykodon, podczas gdy żadna z dawek PZM21 nie miała działania wzmacniającego.

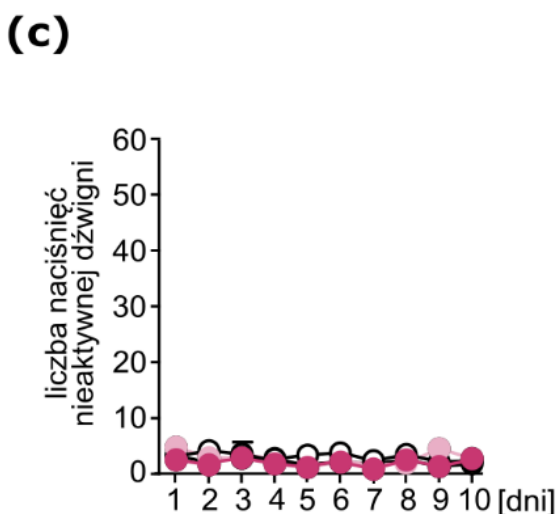
Wyniki

Po zakończeniu pierwszej części doświadczenia, szczury poddano wymuszonej abstynencji. Po upływie 3 dni umieszczono je ponownie w klatkach Skinnera i zmierzono wskaźniki świadczące o poszukiwaniu substancji. W tych warunkach naciśnięcie aktywnej dźwigni nie skutkowało infuzją, lecz prezentacją bodźców warunkowych, uprzednio skojarzonych z działaniem samopodawanej substancji. Otrzymane dane wskazały, że jedynie szczury z grupy oksykodonowej wykonały istotnie więcej naciśnień dźwigni aktywnej niż nieaktywnej, co jest wskaźnikiem głodu substancji i jej poszukiwania w okresie abstynencji (dwuczynnikowa ANOVA: efekt interakcji (grupa x rodzaj dźwigni: $F_{(3,58)}=10,81$, $p<0,0001$, **Rycina 20**). Podobny efekt nie miał miejsca w grupach samopodających sobie PZM21, co wskazuje na brak poszukiwania substancji w trakcie wymuszonej abstynencji.

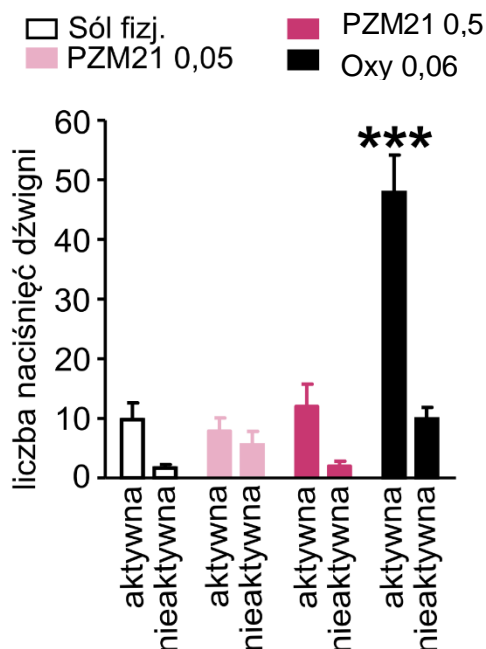


Rycina 19. Efekty PZM21 w procedurze dożylnego samopodawania substancji.

Szczury trenowano w klatkach Skinnera, w których znajdowała się dźwignia aktywna, której naciśnięcie skutkowało dożylną infuzją substancji oraz dźwignia nieaktywna, której naciśnięcie nie miało konsekwencji. (a) Szczury z grupy samopodającej sobie oksykodon (Oxy; 0,06 mg/kg/infuzję) dostarczały sobie większej liczby infuzji w trakcie kolejnych dni doświadczenia. Liczba infuzji w grupach samopodających sobie PZM21 (0,05 i 0,5 mg/kg/infuzję) lub sól fizjologiczną nie wzrastała istotnie wraz z kolejnymi sesjami. (b-c) Szczury z grupy samopodającej sobie oksykodon wykonywały istotnie więcej naciśnień dźwigni aktywnej niż nieaktywnej.



Zwierzęta z pozostałych grup wykonywały zbliżoną liczbę naciśnień obu dźwigni. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ (test Dunnetta). W (a) analizie statystyczną przeprowadzono porównując zmianę efektu wewnątrz każdej grupy względem pierwszego dnia doświadczenia, natomiast w (b-c) analizowano różnice między liczbą naciśnień dźwigni aktywnej a nieaktywnej wewnątrz każdej grupy każdego dnia.



Rycina 20. Poszukiwanie substancji w okresie wymuszonej abstynencji od PZM21.

Szczury umieszczono w klatkach Skinnera i pozwolono na naciskanie dźwigni, jednak naciśnięcie dźwigni aktywnej nie skutkowało infuzją substancji. Pomimo tego, szczury z grupy samopodającej sobie uprzednio oksykodon (Oxy; 0,06 mg/kg/ infuzję) wykonywały istotnie więcej naciśnień dźwigni aktywnej niż nieaktywnej, co świadczy o głodzie substancji i jej poszukiwaniu. W grupach PZM21 (0,05 i 0,5 mg/kg/infuzję) i soli fizjologicznej (0,0125 ml/infuzję) liczba reakcji wobec dźwigni aktywnej i nieaktywnej nie różniła się istotnie. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, *** $p < 0,001$ (test Dunnetta). W analizie statystycznej porównywano liczbę reakcji wobec dźwigni aktywnej a nieaktywnej wewnątrz każdej grupy.

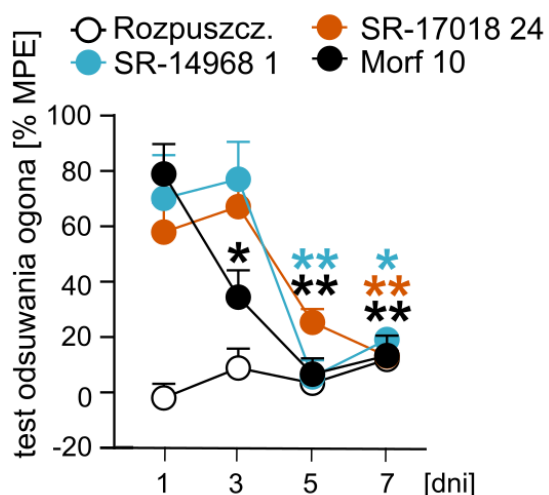
SR-14968 i SR-17018

Uzależniający potencjał SR-14968 i SR-17018 został przebadany z uwzględnieniem rozwoju tolerancji na ich działanie antynocyceptywne, a także wpływu na występowanie zależności fizycznej przejawiającej się zespołem odstawienia. Zbadano ponadto wpływ tych substancji na aktywność lokomotoryczną po podaniu jednorazowym i w trakcie podań wielokrotnych oraz ich potencjalne działanie nagradzające. Do tego etapu badań wybrano pojedyncze dawki obu związków. W przypadku SR-14968 testowano dawkę 1 mg/kg (z wyjątkiem doświadczenia, w którym badano wpływ agonisty na zależność fizyczną, gdzie z obawy przed złym stanem zdrowia zwierząt w trakcie chronicznych podań zdecydowano podawać im dawkę 0,3 mg/kg), natomiast SR-17018 badany był w dawce 24 mg/kg. Uzasadnienie tej decyzji zawarto w Dyskusji.

Tolerancja na działanie antynocyceptywne

Tolerancja na działanie antynocyceptywne SR-14968 i SR017018 w trakcie wielokrotnych podań została zbadana przy wykorzystaniu testu odsuwania ogona. Zwierzęta otrzymywały (ip.) SR-14968 (1 mg/kg), SR-17018 (24 mg/kg), morfinę (10 mg/kg) lub rozpuszczalnik (10 ml/kg) przez 7 kolejnych dni. Pomiar wrażliwości na bodziec bólowy przeprowadzono w 1, 3, 5 oraz 7 dniu trwania doświadczenia, 1 godzinę po podaniu związków. Dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami wykazała istotny statystycznie efekt interakcji (grupa x czas:

$F_{(9,105)}=5,463$, $p<0,0001$), wskazując na rozwój tolerancji w trakcie chronicznych podań substancji. Analiza post-hoc pozwala jednak stwierdzić, że w przypadku obu agonistów SR rozwój tolerancji jest opóźniony, gdyż w grupie myszy traktowanych morfiną tolerancja pojawiła się już w 3 dniu doświadczenia, natomiast w grupach otrzymujących agonistów SR efekt tolerancji osiągnął znamienność statystyczną w 5/7 dniu eksperymentu (**Rycina 21**).



Rycina 21. Tolerancja na antynocyceptywne działanie SR-14968 i SR-17018.

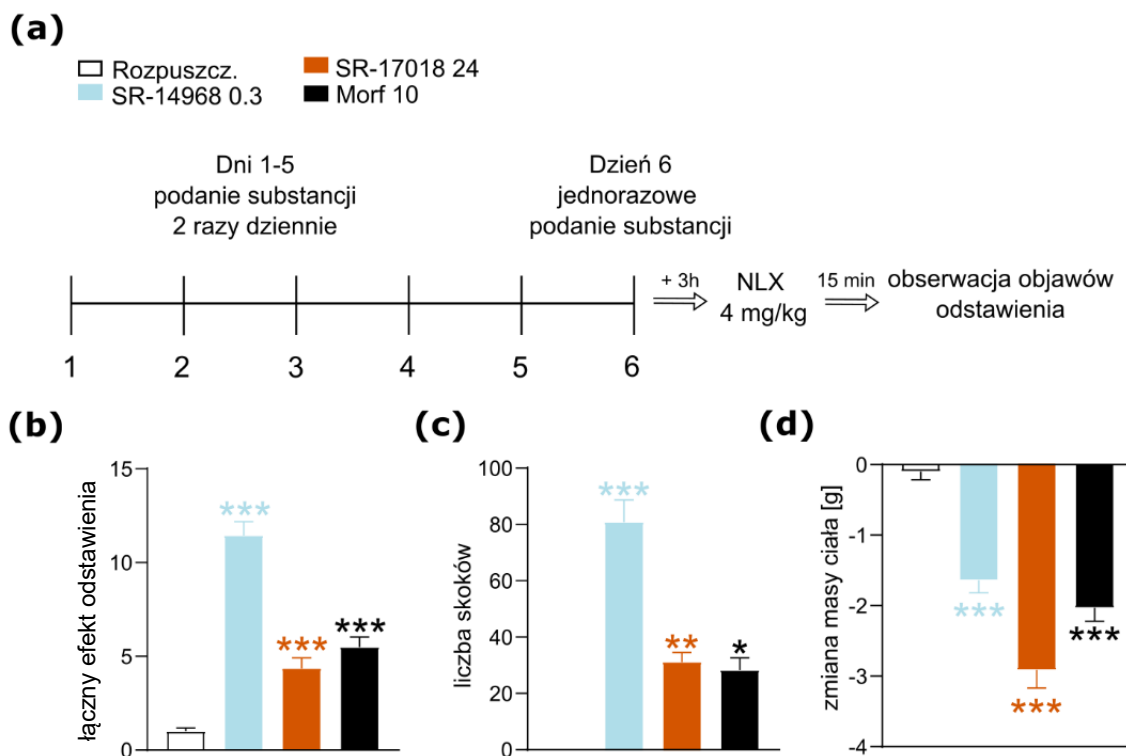
Wielokrotne (1 raz dziennie przez 7 dni), podania SR-14968 (1 mg/kg, ip.), SR-17018 (24 mg/kg, ip.) oraz morfiny (Morf; 10 mg/kg, ip.) wywołały rozwój tolerancji antynocyceptywnej w teście odsuwania ogona, który przeprowadzano 1 godzinę po podaniu substancji. W grupie otrzymującej SR-14968 tolerancja osiągnęła znamienność statystyczną w 5 dniu doświadczenia, a w grupie SR-17018 w ostatnim dniu pomiarów. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ (test Dunnetta, kolory symboli odpowiadają kolorom, którymi oznaczono grupy). Analizę statystyczną przeprowadzono porównując zmianę efektu wewnątrz każdej grupy względem pierwszego dnia doświadczenia.

Zależność fizyczna i zespół odstawienia precypitowany naloksonem

Zależność fizyczna od SR-14968 oraz SR-17018 została oceniona za pomocą pomiaru objawów odstawienia precypitowanego podaniem naloksonu (4 mg/kg) myszom, którym chronicznie podawano SR-14968 (0,3 mg/kg), SR-17018 (24 mg/kg), morfinę (10 mg/kg) lub rozpuszczalnik (10 ml/kg). Wszystkie podania wykonywano ip. Schemat doświadczenia przedstawiono na **Rycinie 22a**. Pomiar objawów odstawienia wykazał istotny statystycznie wzrost symptomów świadczących o zespole odstawienia w grupach myszy chronicznie otrzymujących SR-14968, SR-17018 oraz morfinę (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(3,35)}=65,99$, $p<0,0001$, **Rycina 22b**). W tych samych grupach odnotowano także istotny statystycznie wzrost liczby skoków, uznawanych za najbardziej typowy i powszechny objaw odstawienia u myszy (test Kruskala-Wallisa: $H_{(3)}=31,33$, $p<0,0001$, **Rycina 22c**). Analiza zmiany masy ciała wewnątrz każdej z grup doświadczalnych, mająca na celu ocenę wpływu chronicznych podań substancji na ogólny stan zdrowia zwierząt, wykazała istotny statystycznie spadek masy ciała w grupach otrzymujących agonistów SR i morfinę

Wyniki

(jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(3,35)}=38,18$, $p<0,0001$, **Rycina 22d**). Objawy odstawienia były wyjątkowo nasilone w grupie zwierząt otrzymujących SR-14968, co świadczy o silnym potencjale uzależniającego tego agonisty, nawet w bardzo niskich dawkach.



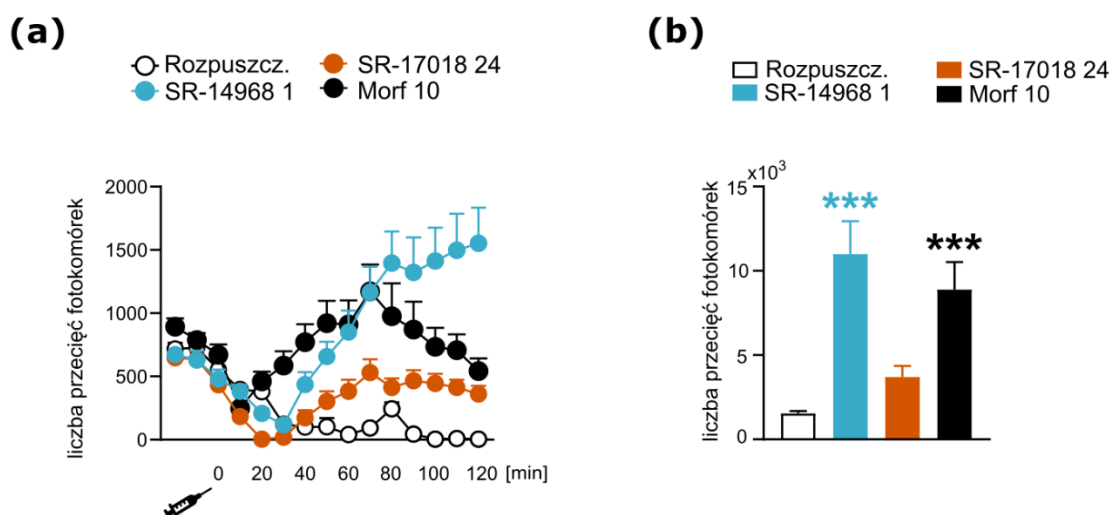
Rycina 22. Zależność fizyczna i zespół odstawienia precypitowanego naloksonem po chronicznych podaniach SR-14968 i SR-17018.

(a) Mysiom wielokrotnie podawano (ip.) SR-14968 (0,3 mg/kg), SR-17018 (24 mg/kg), morfinę (Morf; 10 mg/kg) lub rozpuszczalnik zgodnie z przedstawionym schematem. Po precypitacji odstawienia za pomocą podania naloksonu (NLX; 4 mg/kg, ip.) zaobserwowano **(b)** wzrost łącznego efektu odstawienia oraz **(c)** wzrost liczby skoków u myszy otrzymujących agonistów SR oraz morfinę. Odstawienie było szczególnie nasilone u myszy z grupy SR-14968. **(d)** W tych samych grupach odnotowano spadek masy ciała wynikający z chronicznych podań substancji. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ((b i d) test Dunnetta, (c) test Dunna), grupy otrzymujące SR-14968, SR-17018 oraz morfinę porównano do grupy myszy, którym podawano rozpuszczalnik.

Aktywność lokomotoryczna po jednorazowych i wielokrotnych podaniach

W kolejnym etapie badań ocenie poddano efekty podań SR-14968 (1 mg/kg), SR-17018 (24 mg/kg) oraz substancji kontrolnych, morfiny (10 mg/kg) i rozpuszczalnika (10ml/kg), na aktywność lokomotoryczną myszy. Na początku aktywność zwierząt zmierzono po jednorazowym podaniu substancji, które poprzedzono adaptacją myszy do klatek, podobnie jak w przypadku doświadczenia z wykorzystaniem PZM21. Następnie zwierzęta otrzymały podania odpowiednich

substancji, a pomiar trwał kolejne 2 godziny. Wyniki tego etapu doświadczenia przedstawia **Rycina 23**. Aby zobrazować przebieg aktywności lokomotorycznej dane przedstawiono w sposób poglądowy przedstawiając je w 10-minutowych odstępach czasowych. Odnotowano międzygrupowe różnice poziomie aktywności lokomotorycznej w różnych punktach czasowych (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami: efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(33,396)}=12,79$, $p<0,0001$, **Rycina 23a**). Sumaryczny wskaźnik aktywności lokomotorycznej w ciągu 2 godzin także wskazał istotne różnice w aktywności myszy (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(3,36)}=11,29$, $p<0,0001$, **Rycina 23b**). Analiza post-hoc wykazała, że w nasilenie aktywności lokomotorycznej było istotne w grupach, które otrzymały podania SR-14968 lub morfiny.



Rycina 23. Aktywność lokomotoryczna po jednorazowych podaniach SR-14968 i SR-17018.

(a) Zwierzęta przez 30 minut adaptowano do klatek, a następnie podano im substancje (ip.): SR-14968 (1 mg/kg), SR-17018 (24 mg/kg), morfinę (Morf; 10 mg/kg) lub rozpuszczalnik, po czym aktywność mierzono przez kolejne 2 godziny w 10-minutowych odstępach. **(b)** Całkowita aktywność lokomotoryczna myszy w ciągu 2 godzin była nasiloną w sposób istotny statystycznie w grupach, które otrzymały SR-14968, SR-17018 lub morfinę. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, *** $p<0,001$ (test Holma-Sidaka, porównanie do grupy myszy, które otrzymały rozpuszczalnik). Dla przejrzystości prezentowanych danych nie oznaczono istotności efektów na wykresie przedstawiającym przebieg czasowy aktywności lokomotorycznej badanych grup.

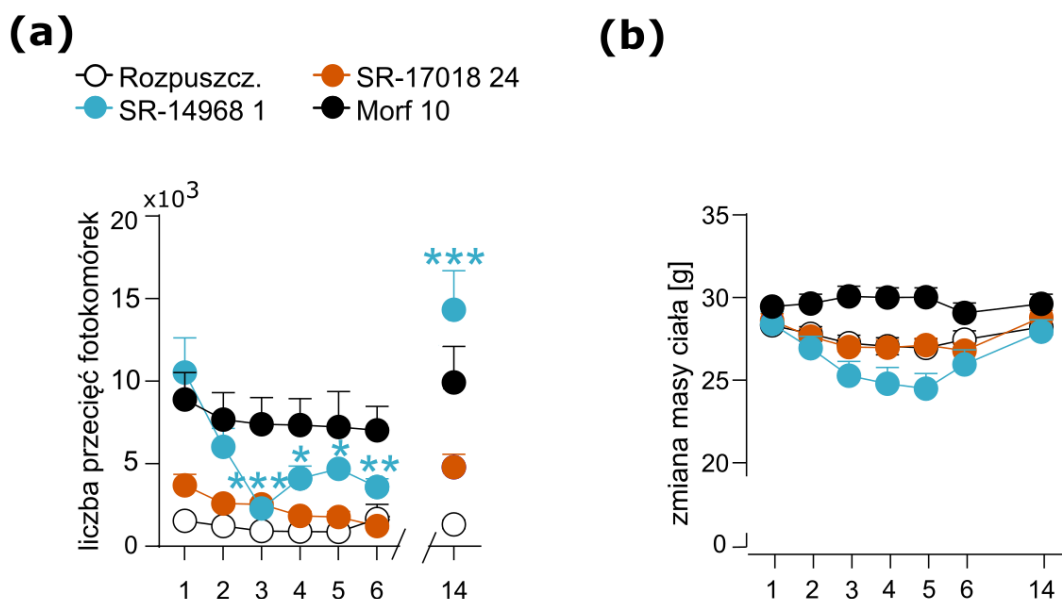
Ten sam schemat podań i pomiary kontynuowano podczas kolejnych dni, aby określić zmiany aktywności lokomotorycznej w czasie. Analiza danych (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami) wykazała istotny statystycznie efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(18,245)}=2,583$, $p=0,0006$), co wskazuje na zależne od czasu zmiany w aktywności lokomotorycznej w badanych grupach (**Rycina 24a**).

Wyniki

Zaobserwowano jednak zaskakujący kierunek zmian – w grupie SR-14968 aktywność lokomotoryczna uległa tolerancji, podczas gdy żadnych istotnych zmian nie odnotowano u myszy otrzymujących podania SR-17018 lub morfiny. Po 8 dniach inkubacji przeprowadzono pomiar ekspresji aktywności lokomotorycznej, którego wyniki wskazują, na bardzo wysoką ekspresję aktywności w grupie SR-14968 (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami: efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(3,70)}=6,093$, $p=0,0010$)). Wyniki otrzymane w eksperymencie wykazują zatem, że SR-14968 nasila aktywność lokomotoryczną myszy po jednorazowym podaniu. Agonista ten cechuje się nietypowym wpływem na zmiany aktywności lokomotorycznej w czasie, gdyż na początkowy efekt nasilenia aktywności rozwija się tolerancja, a po okresie inkubacji następuje bardzo wysoka ekspresja aktywności. Przebiegowi aktywności lokomotorycznej towarzyszą charakterystyczne zmiany masy ciała (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami: efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(18,245)}=1,514$, $p=0,0853$), **Rycina 24b**) polegające na początkowym jej spadku, późniejszej stabilizacji i powrocie do stanu wyjściowego. Można spekulować, że tolerancja aktywności lokomotorycznej jest częściowo związana ze złym stanem zwierząt wynikającym z wyczerpania i odwodnienia.

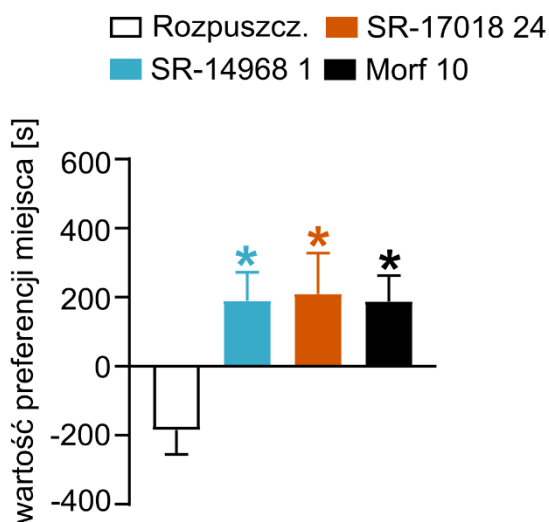
Warunkowana preferencja miejsca

Charakterystykę uzależniającego potencjału SR-14968 i SR-17018 zakończono oceną efektów tych agonistów w teście warunkowanej preferencji miejsca, służącym określeniu ich nagradzających właściwości. W ramach procedury zbadano wpływ podań ip. SR-14968 (1 mg/kg), SR-17018 (24 mg/kg) oraz morfiny (10 mg/kg) i rozpuszczalnika (10ml/kg) na wykształcenie preferencji wobec kontekstu skojarzonego z podaniem potencjalnie nagradzającej substancji. Otrzymane dane wykazały, że zarówno myszy z grup otrzymujących agonistów SR, jak i morfinę, wykształciły preferencję względem kontekstu skojarzonego z ich podaniami (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(3,33)}=4,266$, $p=0,0119$, **Rycina 25**). W doświadczeniu zaobserwowano, że rozpuszczalnik, w którym przygotowywano roztwory agonistów SR i morfiny, może mieć działanie awersyjne. Grupa otrzymująca rozpuszczalnik jest jednak odpowiednią kontrolą dla pozostałych grup wykorzystanych w doświadczeniu i różnice między nią a grupami warunkowanymi na agonistów receptora μ wskazują, że SR-14968 i SR-17018 posiadają właściwości nagradzające.



Rycina 24. Aktywność lokomotoryczna w trakcie wielokrotnych podań SR-14968 i SR-17018.

(a) Zwierzęta otrzymywały podania (ip.) SR-14968 (1 mg/kg), SR-17018 (24 mg/kg), morfiny (Morf; 10 mg/kg) lub rozpuszczalnika, po czym ich aktywność mierzono przez 2 godziny w trakcie 6 kolejnych dni oraz dodatkowo po 8-dniowym okresie inkubacji. U myszy otrzymujących SR-14968 odnotowano tolerancję lokomotoryczną, natomiast w pozostałych grupach aktywność nie zmieniała się istotnie podczas 6-dniowych pomiarów. W grupie zwierząt otrzymujących SR-14968 zaobserwowano nasilenie aktywności (ekspresję) po okresie inkubacji. **(b)** Wielokrotne podania związków, szczególnie SR-14968, wpłynęły na charakterystyczny przebieg zmian masy ciała myszy. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (test Sidaka). Analizę statystyczną przeprowadzono porównując zmianę efektu wewnątrz każdej grupy względem pierwszego dnia doświadczenia (do dnia 6), natomiast ekspresję sensytyzacji obliczono porównując aktywność wewnątrz każdej grupy z dnia 6 do dnia 14.



Rycina 25. Działanie SR-14968 i SR-17018 w teście warunkowanej preferencji miejsca.

Myszy poddano procedurze warunkowanej preferencji miejsca, w której otrzymywały podania (ip.) SR-14968 (1 mg/kg), SR-17018 (24 mg/kg), morfiny (Morf; 10 mg/kg) lub rozpuszczalnika (podczas warunkowań kontrolnych wszystkie grupy otrzymywały podania rozpuszczalnika). Myszy z grup otrzymujących SR-14968, SR-17018 lub morfinę wykształciły preferencję względem kontekstu skojarzonego z działaniem związków. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, * $p < 0,05$ (test Dunnetta). Efekty agonistów SR i morfiny porównane zostały do efektów obserwowanych w grupie otrzymującej rozpuszczalnik.

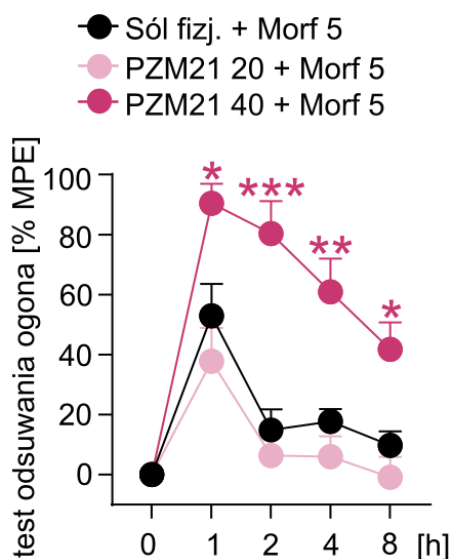
3. Modulacja behawioralnych efektów morfiny przez PZM21, SR-14968 i SR-17018

PZM21

W ramach oceny wpływu PZM21 na behawioralne efekty morfiny zbadano wpływ tego agonisty na wywołaną morfiną antynocycepcję i rozwój tolerancji na ten efekt, a także na objawy zespołu odstawienia od morfiny precypitowanego naloksonem. Ponadto, mając na uwadze, że PZM21 nie miał działania nagradzającego, przeprowadzono doświadczenie, którego celem była ocena wpływu PZM21 na wywołaną morfiną warunkowaną preferencję miejsca. Do badań wybrano dawki 20 i 40 mg/kg PZM21 (ip.), ponieważ na podstawie wcześniej uzyskanych wyników założono występowanie efektu pułapowego powyżej dawki 40 mg/kg tego agonisty.

Antynocyceptywny efekt morfiny

Do doświadczenia wybrano dawkę 5 mg/kg morfiny, aby uzyskać efekt antynocycepcji na poziomie ~50% MPE. PZM21 lub sól fizjologiczną podano myszom 30 minut przed podaniem morfiny (wszystkie podania ip.). Rezultaty testu odsuwania ogona wykazały, że PZM21 w dawce 40 mg/kg nasila antynocycepcję wywołaną morfiną (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami: efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(8,108)}=5,291$, $p<0,0001$), **Rycina 26**).

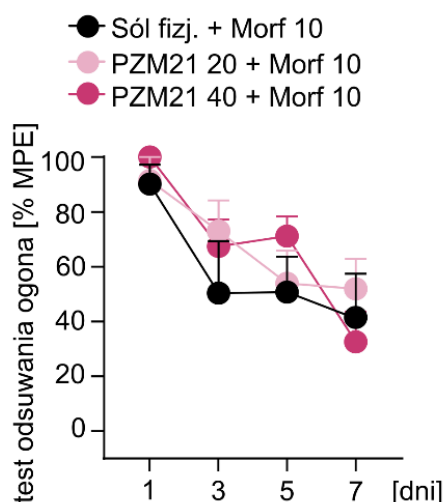


Rycina 26. Wpływ PZM21 na antynocyceptywny efekt morfiny.

Podanie PZM21 (w dawce 40, ale nie 20 mg/kg, ip.), 30 minut przed podaniem morfiny (Morf; 5 mg/kg, ip.), nasiliło wywołaną morfiną antynocycepcję. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ (test Dunnetta). Efekty w grupach otrzymujących jednocześnie PZM21 i morfinę porównano do grupy, która przed morfiną otrzymała sól fizjologiczną.

Tolerancja na antynocyceptywne działanie morfiny

Celem kolejnego doświadczenia była ocena wpływu PZM21 na rozwój tolerancji na antynocyceptywny efekt morfiny. PZM21 (20 i 40 mg/kg, ip.) podawano 30 minut przed morfiną (10 mg/kg, ip.). Rozwój tolerancji mierzono za pomocą testu odsuwania ogona, 1 godzinę po podaniu morfiny. Uzyskane wyniki wykazały jednak, że PZM21 nie wpływa na rozwój tolerancji na antynocyceptywne działanie morfiny (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami: efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(6,69)}=0,999$, $p=0,4331$), **Rycina 27**).

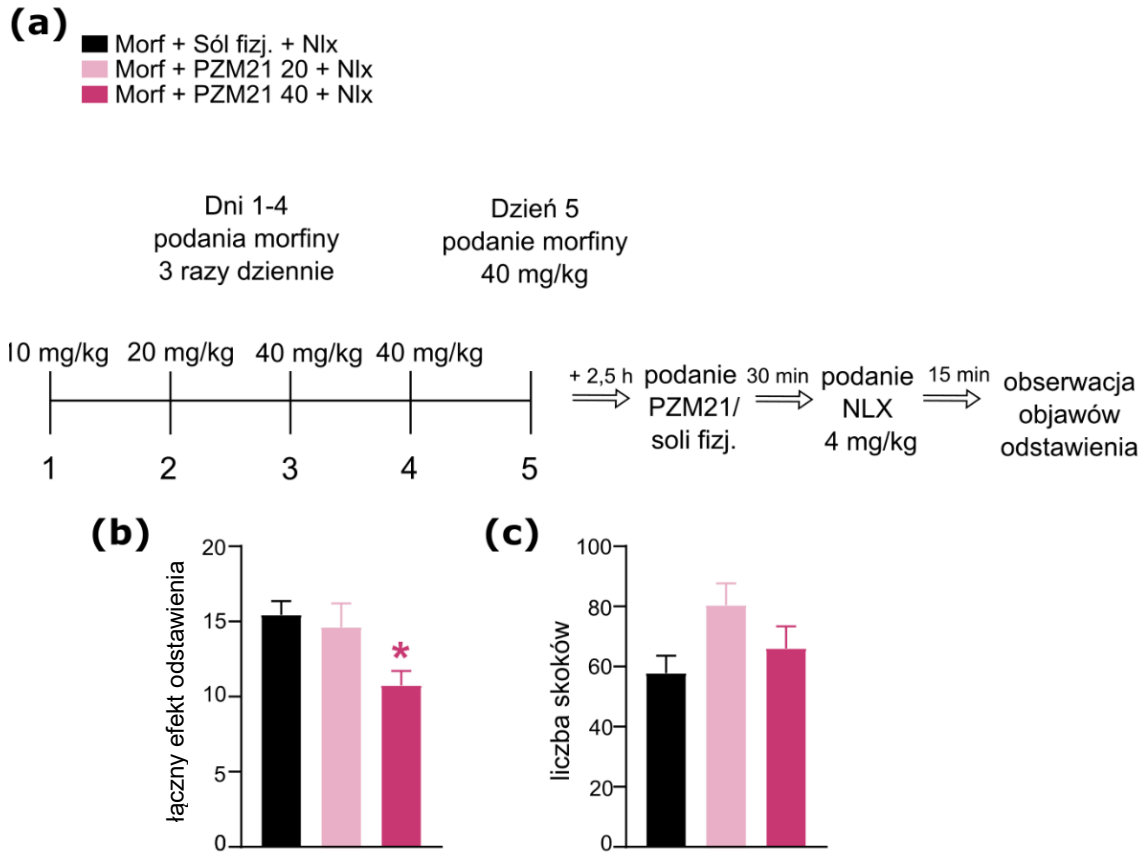


Rycina 27. Wpływ PZM21 na tolerancję na antynocyceptywne działanie morfiny.

PZM21 (20 i 40 mg/kg, ip.) podawany 30 minut przed morfiną (Morf; 10 mg/kg, ip.) przez 7 kolejnych dni nie wpłynął na rozwój tolerancji na antynocyceptję wywołaną morfiną. Antynocyceptję mierzono za pomocą testu odsuwania ogona, 1 godzinę po podaniu morfiny. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM.

Zależność fizyczna od morfiny i zespół odstawienia precypitowany naloksonem

Następnie przebadany został wpływ PZM21 (20 i 40 mg/kg, ip.) na nasilenie objawów zespołu odstawienia u zwierząt chronicznie otrzymujących morfinę (podania wzrastających dawek, sc., zgodnie z legendą na **Rycinie 28a**). PZM21 podano myszom 30 minut przed precypitacją odstawienia za pomocą naloksonu (4 mg/kg, ip.). Przez 15 minut obserwowano objawy odstawienia, a otrzymane wyniki wykazały, że podanie PZM21 w dawce 40 mg/kg osłabia łączny efekt odstawienia od morfiny (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(2,27)}=4,352$, $p=0,0230$, **Rycina 28b**). Nie odnotowano istotnych statystycznie zmian w liczbie skoków pomiędzy grupami, ale zauważalny jest niewielki wzrost liczby skoków w grupach, które przed wywołaniem odstawienia otrzymały PZM21 (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(2,27)}=2,765$, $p=0,0808$, **Rycina 28c**).



Rycina 28. Wpływ PZM21 na objawy zespołu odstawienia precypitowanego naloksonem u myszy uzależnionych od morfiny.

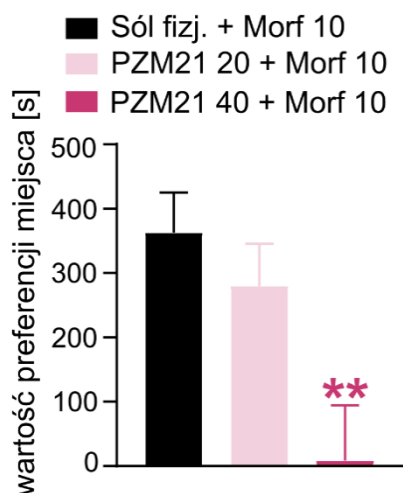
(a) Mysiom wielokrotnie podawano morfinę (Morf; 10-40 mg/kg, sc.), zgodnie z przedstawionym schematem. 30 minut przed precypitacją odstawienia za pomocą podania naloksonu (NLX; 4 mg/kg, ip.) podano im PZM21 (20 lub 40 mg/kg, ip.) lub sól fizjologiczną. **(b)** Podanie PZM21 w dawce 40 mg/kg wpłynęło na osłabienie łącznego efektu odstawienia. **(c)** Odnotowano też nieistotny statystycznie wzrost liczby skoków w grupach, które przed wywołaniem odstawienia otrzymały PZM21. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, * $p < 0,05$ (test Dunnetta). Grupy traktowane PZM21 porównano do grupy, która przed precypitacją odstawienia otrzymała sól fizjologiczną.

Warunkowana preferencja miejsca wywołana morfiną

Z uwagi na brak nagradzającego działania PZM21 przeprowadzono doświadczenie, w którym zbadano wpływ PZM21 na nagradzające efekty morfiny mierzone za pomocą paradygmatu warunkowanej preferencji miejsca. Zwierzęta otrzymywały PZM21 (20 lub 40 mg/kg) lub sól fizjologiczną (10 ml/kg) przed każdym warunkowaniem nagradzającym na morfinę (10 mg/kg; podania wszystkich substancji ip.). Eksperyment miał więc na celu odpowiedź na pytanie czy PZM21 wpływa na nabywanie preferencji miejsca wywołanej morfiną. Otrzymane dane przedstawiono na **Rycinie 29**. Analiza wyników (jednoczynnikowa ANOVA) wykazała, że PZM21 w dawce 40 mg/kg osłabiał preferencję miejsca wywołaną

Wyniki

morfiną ($F_{(2,34)}=6,805$, $p=0,0033$). Doświadczenie wskazuje, że PZM21, w sposób zależny od dawki, może blokować nagradzające efekty morfiny.



Rycina 29. Wpływ PZM21 na warunkowaną preferencję miejsca wywołaną morfiną.

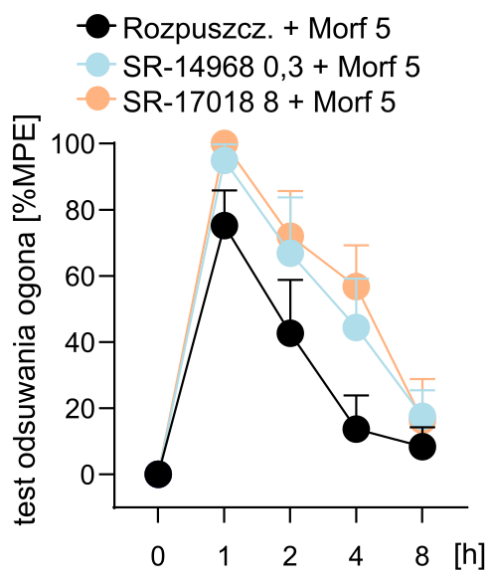
Myszy poddano procedurze warunkowanej preferencji miejsca wywołanej morfiną (Morf; 10 mg/kg, ip.). 30 minut przed każdym warunkowaniem na morfinę otrzymywały podania PZM21 (20-40 mg/kg, ip.) lub soli fizjologicznej (podczas warunkowań kontrolnych wszystkie grupy otrzymywały podania soli fizjologicznej w tym samym schemacie). Myszy otrzymujące PZM21 w dawce 40 mg/kg przed sesjami warunkowania na morfinę nie wykazały preferencji miejsca względem kontekstu skojarzonego z jej działaniem. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, $**p<0,01$ (test Dunnetta). Efekty w grupach otrzymujących jednocześnie PZM21 i morfinę porównano do grupy, która przed morfiną otrzymywała sól fizjologiczną.

SR-14968 i SR-17018

W tej części doświadczeń zbadano efekty podań SR-14968 i SR-17018 na antynocyceptywny efekt morfiny i rozwój tolerancji oraz na objawy precypitowanego naloksonem zespołu odstawienia od tego opioidu. W badaniach zastosowano przyjęte wcześniej dawki, tj. 1 mg/kg SR-14968 i 24 mg/kg SR-17018 (ip.), z wyjątkiem pomiaru antynocycepcji wywołanej morfiną, gdzie zastosowano niższe dawki, tj. 0,3 mg/kg SR-14968 i 8 mg/kg SR-17018 (ip.). Było to motywowane wcześniejszą obserwacją świadczącą o tym, że agoniści SR mają silne działanie antynocyceptywne.

Antynocyceptywny efekt morfiny

Do pomiaru wpływu SR-14968 (0,3 mg/kg) i SR-17018 (8 mg/kg) na wywołaną morfiną antynocycepcję wykorzystano test odsuwania ogona. Agonistów SR lub rozpuszczalnik podano myszom 30 minut przed zastrzykiem morfiny (5 mg/kg, ip.). Analiza danych (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami) wykazała brak statystycznie istotnego efektu interakcji (grupa x czas: $F_{(8,96)}=0,7646$, $p=0,6347$, **Rycina 30**). Widoczna jest jednak tendencja w kierunku nasilania odpowiedzi antynocyceptywnej u zwierząt, które oprócz morfiny, dodatkowo otrzymały SR-14968 lub SR-17018 (efekt grupy: $F_{(2,288, 54,91)}=37,71$, $p<0,0001$).

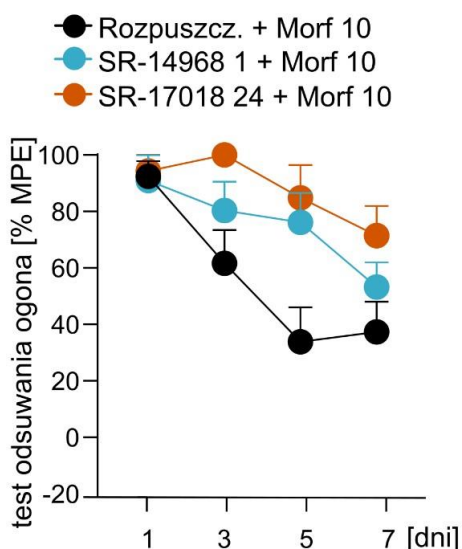


Rycina 30. Wpływ SR-14968 i SR-17018 na antynocyceptywny efekt morfiny.

Podania SR-14968 (0,3 mg/kg, ip.) i SR-17018 (8 mg/kg, ip.) 30 minut przed podaniem morfiny (Morf; 5 mg/kg, ip.) nieznacznie nasiliły wywołaną przez morfinę antynocycepcję. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM.

Tolerancja na antynocyceptywne działanie morfiny

W następnym doświadczeniu zbadano wpływ podań ip. SR-14968 (1 mg/kg) i SR-17018 (24 mg/kg) na rozwój tolerancji na antynocyceptywne działanie morfiny (10 mg/kg, ip.). Agonistów SR lub rozpuszczalnik (10 ml/kg) podawano 30 minut przed morfiną przez 7 kolejnych dni, a rozwój tolerancji mierzono w teście odsuwania ogona, 1 godzinę po podaniu morfiny. Analiza uzyskanych wyników nie wykazała istotnych statystycznie różnic (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami: efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(6,81)}=1,459$, $p=0,2026$), **Rycina 31**), jednak można zauważyć tendencję wskazującą, że u myszy jednocześnie otrzymujących jednego z agonistów SR i morfinę tolerancja rozwijała się wolniej, niż u myszy, które przed morfiną otrzymały rozpuszczalnik (efekt grupy: efekt grupy: $F_{(2,27)}=12,82$, $p=0,0001$).

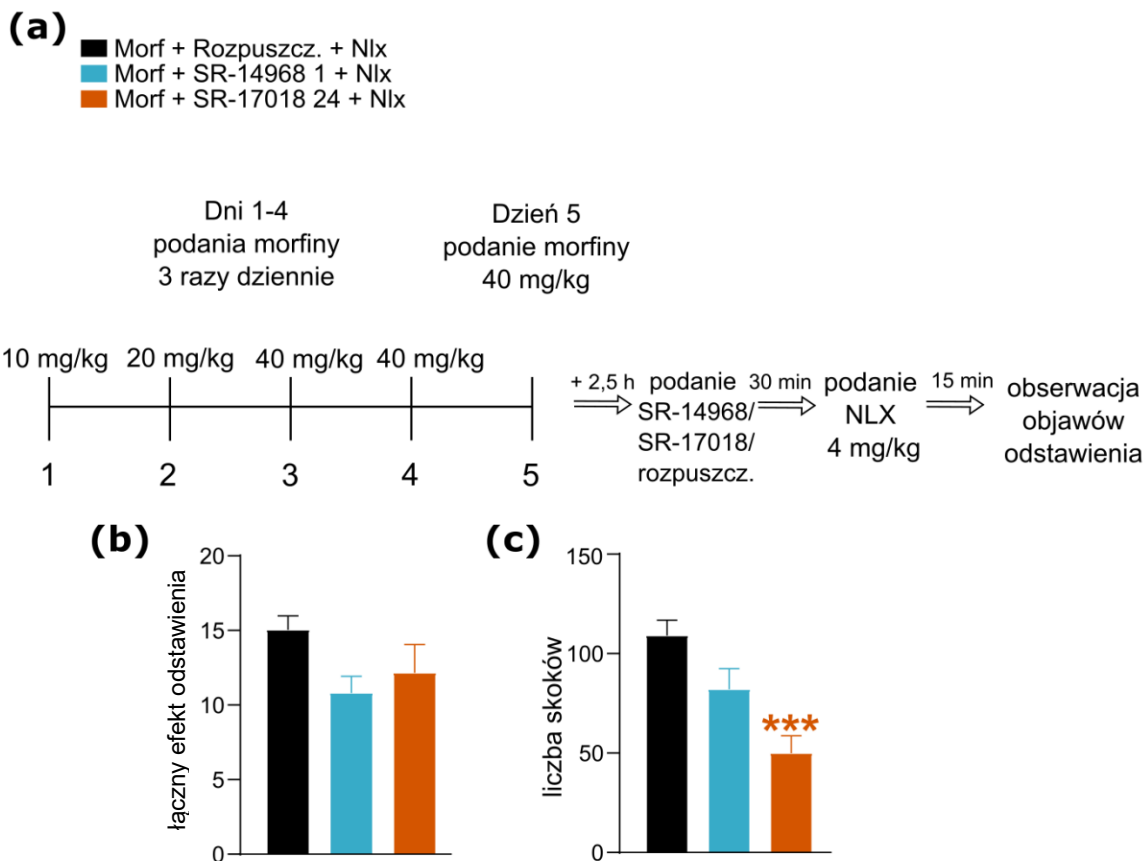


Rycina 31. Wpływ SR-14968 i SR-17018 na tolerancję na antynocyceptywne działanie morfiny.

Agoniści SR-14968 (1 mg/kg, ip.) i SR-17018 (24 mg/kg, ip.) podawani 30 minut przed morfiną (Morf; 10 mg/kg, ip.) przez 7 kolejnych dni lekko opóźnili (w stopniu nieistotnym statystycznie) rozwój tolerancji na antynocyceptywny efekt morfiny. Antynocycepcję mierzono za pomocą testu odsuwania ogona, 1 godzinę po podaniu morfiny. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM.

Zależność fizyczna od morfiny i zespół odstawienia precypitowany naloksonem

SR-14968 i SR-17018 przebadano także pod kątem ich wpływu na nasilenie objawów zespołu odstawienia u zwierząt chronicznie otrzymujących morfina (podania wzrastających dawek, sc., zgodnie z legendą na **Rycinie 32a**). SR-14968 (1 mg/kg), SR-17018 (24 mg/kg) lub rozpuszczalnik (10 ml/kg) podano myszom ip. 30 minut przed precypitacją odstawienia za pomocą naloksonu (4 mg/kg, ip.). Wyniki otrzymane podczas 15-minutowej obserwacji objawów odstawienia wykazały, że obaj agoniści SR lekko osłabiają łączny efekt odstawienia od morfiny (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(2,24)}=2,434$, $p=0,1091$, **Rycina 32b**) oraz powodują spadek liczby skoków (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(2,24)}=10,69$, $p=0,0005$, **Rycina 32c**). Dane wskazują zatem, że związki SR, a szczególnie SR-17018, mogą osłabiać objawy odstawienia od morfiny.



Rycina 32. Wpływ SR-14968 i SR-17018 na objawy zespołu odstawienia precypitowanego naloksonem u myszy uzależnionych od morfiny.

(a) Myszom wielokrotnie podawano morfina (Morf; 10-40 mg/kg, sc.), zgodnie z przedstawionym schematem. 30 minut przed precypitacją odstawienia za pomocą podania naloksonu (NLX; 4 mg/kg, ip.) zwierzętom podano SR-14968 (1 mg/kg, ip.), SR-17018 (24 mg/kg, ip.) lub rozpuszczalnik. **(b)** Podanie agonistów SR nieznacznie (w stopniu nieistotnym statystycznie) osłabiło łączny efekt odstawienia oraz **(c)** skutkowało spadkiem liczby skoków. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, *** $p<0,001$ (test Dunnetta.). Grupy, które przed wywołaniem odstawienia otrzymały związki SR porównano do grupy, która otrzymała rozpuszczalnik).

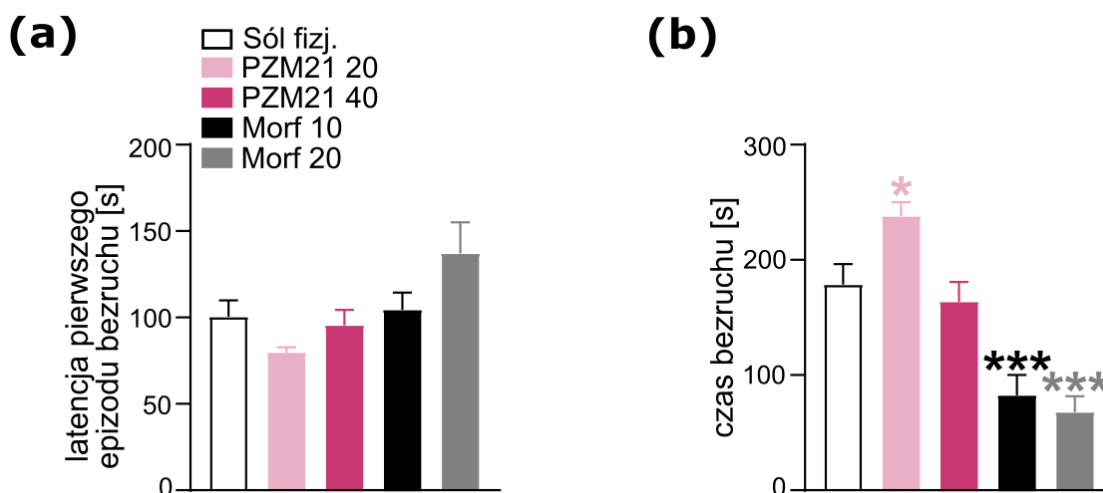
4. Wpływ PZM21 na odpowiedź na stres

Z uwagi na interesujący profil behawioralny PZM21 (brak efektów nagradzających i wzmacniających oraz słaby potencjał do wywoływania zależności fizycznej), związek ten poddano także wstępnym badaniom, których celem była ocena jego wpływu na odpowiedź zwierząt na stres i ich zachowanie w warunkach anksjogennych. Ostrą odpowiedź na stres zmierzono poddając myszy stresowi wymuszonego pływania i zawieszenia za ogon. Są to testy wykorzystywane do mierzenia tzw. bezradności behawioralnej, będącej też miarą zachowań przypominających depresję. Umożliwiają ocenę sposobu reagowania zwierząt w sytuacji niemożliwego do uniknięcia stresu. Lękowość myszy zmierzono przy wykorzystaniu testu jasnego/ciemnego pudełka. Dodatkowo przeprowadzono także warunkowanie strachem, które umożliwiło ocenę konsolidacji pamięci związanej z traumą. W każdym z eksperymentów oceniano efekty PZM21 w dawkach 20 i 40 mg/kg (ip.).

Test wymuszonego pływania

W teście wymuszonego pływania ocenie poddano efekty PZM21 (20 i 40 mg/kg) oraz morfiny (10 i 20 mg/kg) i soli fizjologicznej (10 ml/kg), podanych ip. 30 minut przed testem, na latencję pierwszego epizodu bezruchu oraz całkowity czas bezruchu w trakcie 6 minut testu. Dane wskazały, że podania związków wpływają na latencję pierwszego epizodu bezruchu (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,42)}=3,583$, $p=0,0133$, **Rycina 33a**), jednak zgodnie z analizą post-hoc, efekt nie osiągnął istotności statystycznej między żadnymi porównywanymi grupami. Można odnotować tendencję wskazującą, że morfina, w sposób zależny od dawki, wydłuża latencję, co wskazuje, że myszy, które ją otrzymały wolniej poddają się (dłużej walczą) w sytuacji stresowej. Z kolei analiza wyników dotyczących czasu spędzonego w bezruchu wykazała, że podanie agonistów receptora μ wpływa na czas bezruchu w teście wymuszonego pływania (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,42)}=18,34$, $p<0,0001$, **Rycina 33b**). Analiza post-hoc wykazała, że w porównaniu do myszy, którym podano sól fizjologiczną, zwierzęta, które otrzymały PZM21 (w dawce 20 mg/kg) spędziły więcej czasu w bezruchu, a grupy, które otrzymały podanie morfiny w bezruchu spędziły mniej czasu. Otrzymane dane pozwalają zatem stwierdzić, że PZM21 może

lekko pogarszać zdolność zwierząt do radzenia sobie w sytuacji ostrego stresu, podczas gdy morfina ma w takich warunkach właściwości protekcyjne.

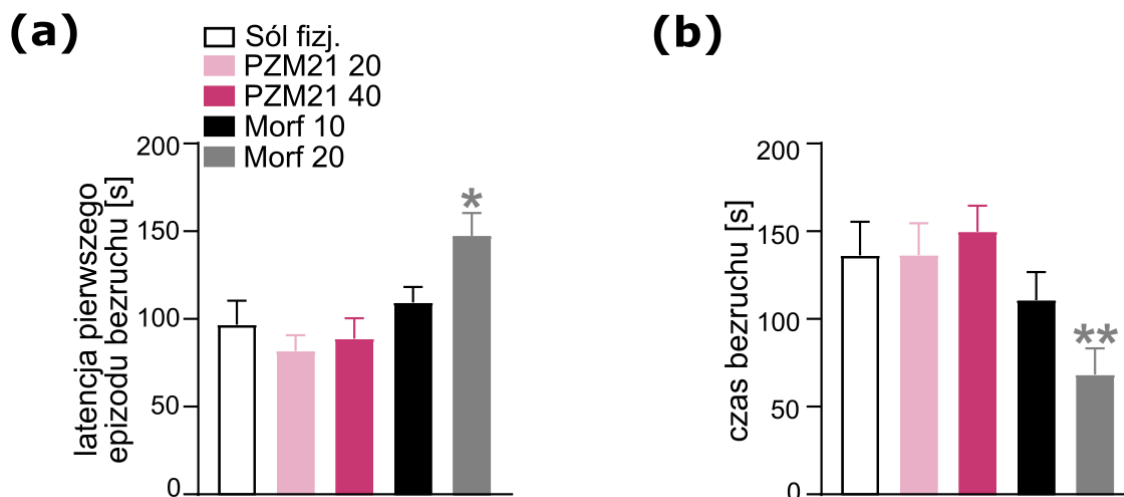


Rycina 33. Efekty PZM21 w teście wymuszonego pływania.

Myszom podano (ip.) PZM21 (20-40 mg/kg), morfinę (Morf; 10-20 mg/kg) lub sól fizjologiczną, a po 30 minutach umieszczono je w zlewce z wodą i przez 6 minut liczono czas spędzony w bezruchu. **(a)** Nie odnotowano znamienych różnic w latencji pierwszego epizodu bezruchu między badanymi grupami. **(b)** Myszy, które otrzymały morfinę spędziły w bezruchu istotnie mniej czasu niż grupa kontrolna. PZM21 w dawce 20 mg/kg wydłużył czas bezruchu. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (test Dunnetta). Wszystkie grupy porównano do grupy, która otrzymała sól fizjologiczną.

Test zawieszenia za ogon

Test zawieszenia za ogon przeprowadzono przy wykorzystaniu takich samych grup i warunków eksperymentalnych jak w teście wymuszonego pływania. Wyniki tego testu wykazały, że podane substancje wpływają na latencję pierwszego epizodu bezruchu (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,43)}=4,991$, $p=0,0021$, **Rycina 34a**) oraz na całkowity czas bezruchu (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,43)}=3,572$, $p=0,0133$, **Rycina 34b**). Analiza danych post-hoc wskazała, że różnice dotyczą grupy zwierząt, która otrzymała morfinę w dawce 20 mg/kg. Myszy z tej grupy odznaczały się dłuższą latencją oraz więcej czasu pozostawały w bezruchu, co może wskazywać na zwiększoną odporność w sytuacji ostrego stresu. W teście nie odnotowano wpływu PZM21 na zachowanie zwierząt.

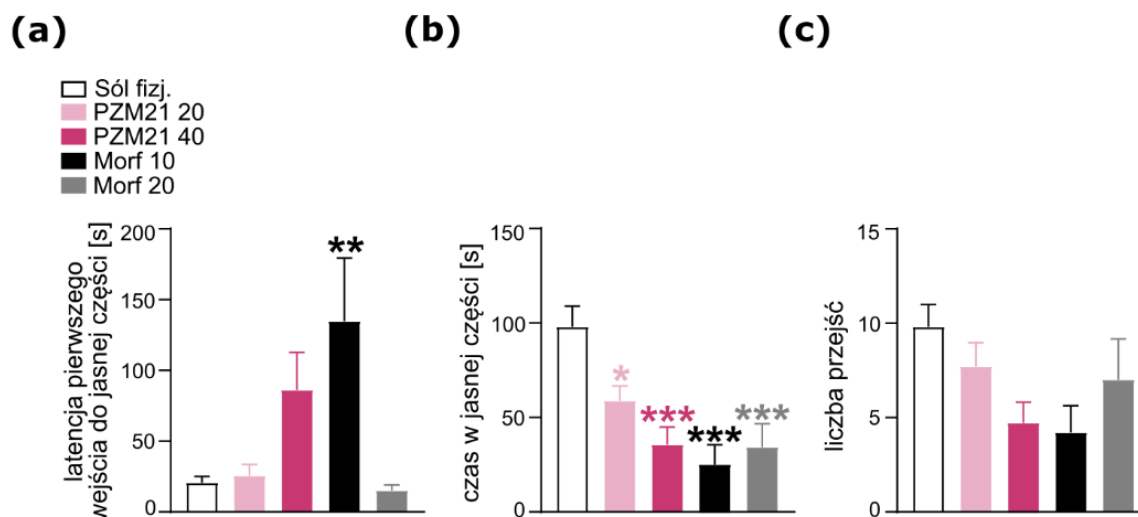


Rycina 34. Efekty PZM21 w teście zawieszenia za ogon.

Myszom podano (ip.) PZM21 (20-40 mg/kg), morfinę (Morf; 10-20 mg/kg) lub sól fizjologiczną, a po 30 minutach zawieszono je za ogon na platformie umieszczonej nad podłogą i przez 6 minut liczono czas spędzony w bezruchu. **(a)** Myszy, które otrzymały morfinę w dawce 20 mg/kg wykazały dłuższą latencję pierwszego epizodu bezruchu oraz **(b)** spędziły w bezruchu istotnie mniej czasu niż grupa kontrolna. PZM21 nie zmienił reakcji myszy w tym teście. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (test Dunnetta). Wszystkie grupy porównano do grupy, która otrzymała sól fizjologiczną.

Test jasnego/ciemnego pudełka

Test jasnego/ciemnego pudełka miał na celu ocenę lękowości myszy, które 30 minut przed testem otrzymały podania PZM21 (20 i 40 mg/kg), morfiny (10 i 20 mg/kg) lub soli fizjologicznej (10 ml/kg). W teście mierzono latencję pierwszego wejścia do jasnej części aparatu, całkowity czas spędzony w tej części oraz liczbę przejść między jasnym a ciemnym kompartymencie. Analiza uzyskanych wyników wykazała, że podanie substancji miało wpływ na opóźnienie pierwszego wejścia do jasnej części aparatu (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,45)}=4,872$, $p=0,0024$, **Rycina 35a**), czas spędzony w jasnym kompartymencie (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,45)}=8,054$, $p < 0,0001$, **Rycina 35b**) oraz na tendencję nasilenia różnic w liczbie przejść (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,45)}=2,377$, $p=0,0660$, **Rycina 35c**). Zgodnie z analizą post-hoc, latencja była wyższa w grupie, która otrzymała morfinę w dawce 10 mg/kg, natomiast wszystkie grupy (które otrzymały PZM21 lub morfinę) spędziły mniej czasu w jasnej części aparatu. Dane otrzymane w doświadczeniu wskazują, że zarówno podania PZM21, jak i morfiny wpływają na nasilenie lękowości u myszy.



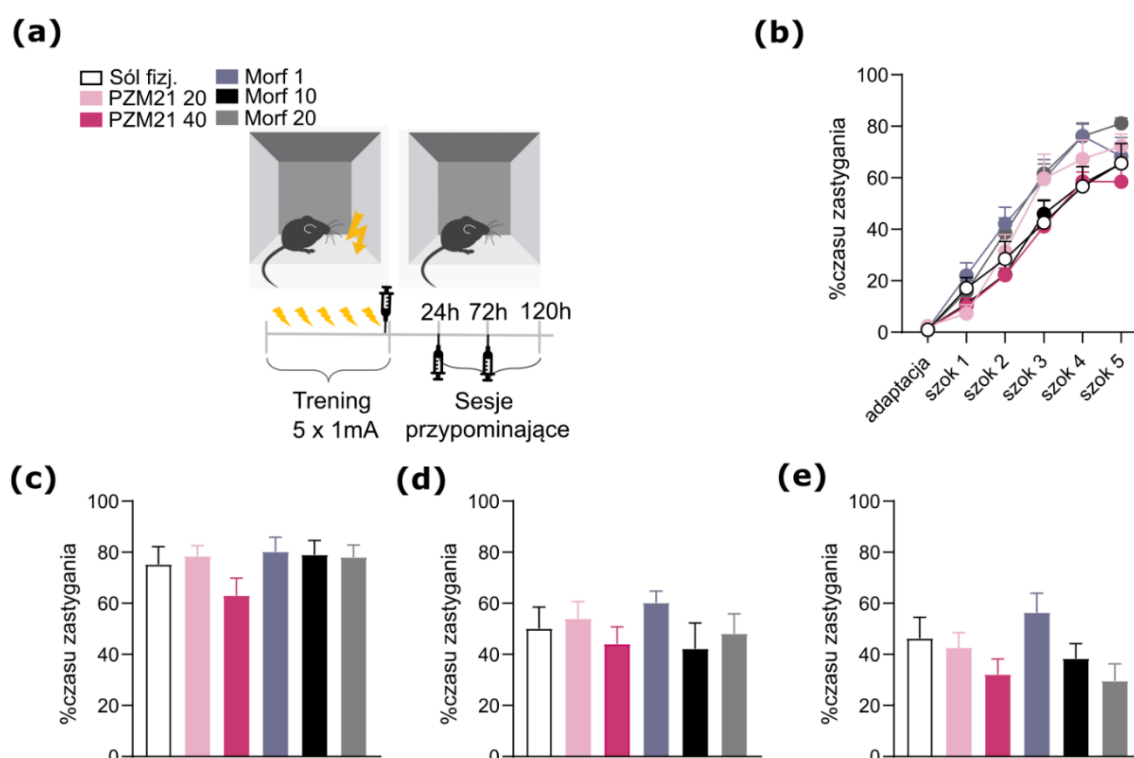
Rycina 35. Wpływ PZM21 na lękowość w teście jasnego/ciemnego pudełka.

Myszom podano (ip.) PZM21 (20-40 mg/kg), morfinę (Morf; 10-20 mg/kg) lub sól fizjologiczną, a po 30 minutach umieszczono je w ciemnej części aparatu i przez 5 minut liczono czas spędzony w jasnej części i liczbę przejść między kompartymentami. **(a)** Myszy, które otrzymały morfinę w dawce 10 mg/kg wykazały dłuższy czas do pierwszego wejścia do jasnej części pudełka **(b)** Zwierzęta, które otrzymały PZM21 lub morfinę (w całym zakresie badanych dawek) spędziły mniej czasu w jasnej części aparatu. **(c)** Myszy, którym podano PZM21 (40 mg/kg) i morfinę (10 mg/kg) wykazały tendencję w kierunku mniejszej liczby przejść między obiema częściami aparatu. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (test Dunnetta). Wszystkie grupy porównano do grupy, która otrzymała sól fizjologiczną.

Warunkowanie strachem

W kolejnym doświadczeniu zbadano wpływ PZM21 (20 i 40 mg/kg, ip.) oraz morfiny (1, 10 i 20 mg/kg, ip.) na pamięć związaną ze strachem w teście warunkowania strachem opartym na kontekście. Zwierzęta otrzymywały podania wymienionych agonistów lub kontrolnie soli fizjologicznej (10 ml/kg) natychmiast po odbyciu treningu warunkowania strachem oraz po sesjach przypominających (24 i 72 godziny po treningu). Schemat doświadczenia przedstawiono na **Rycinie 36a**. Podczas treningu, kiedy zwierzęta otrzymywały szoki elektryczne, mierzono ilość czasu spędzonego na reakcji zastygania (ang. *freezing*), będącej behawioralną oznaką nabywania warunkowanej reakcji strachu. Nie odnotowano istotnych zmian w nabywaniu tej reakcji, co świadczy o podobnej podatności na warunkowanie w każdej grupie (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami: efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(25,215)}=1,327$, $p=0,1448$). Analiza statystyczna wykazała natomiast istotność czynnika czasu ($F_{(4,052, 174,2)}= 242,4$, $p < 0,0001$, **Rycina 36b**), co wskazuje na skuteczność modelu i uczenie się przez myszy reakcji strachu. Pomiar ilości czasu reakcji zastygania podczas kolejnych sesji przypominających nie wykazał jednak istotnych różnic między grupami otrzymującymi PZM21/morfinę a grupą, której

podawano sól fizjologiczną (jednoczynnikowa ANOVA: 1 sesja przypominająca $F_{(5,44)}=1,308$, $p=0,2782$, **Rycina 36c**, 2 sesja przypominająca $F_{(5,44)}=0,7537$, $p=0,5879$, **Rycina 36d**, 3 sesja przypominająca $F_{(5,44)}=2,094$, $p=0,0841$, **Rycina 36e**). Wyniki doświadczenia nie wykazały zatem wpływu agonistów opioidowych, PZM21 i morfiny, na warunkowaną reakcję strachu. Można zauważyć tendencję osłabiania reakcji u myszy traktowanych najwyższymi testowanymi dawkami PZM21 i morfiny, jednak pojawia się ona dopiero podczas 3 sesji przypominającej i nie osiąga progu istotności statystycznej.



Rycina 36. Działanie PZM21 w teście warunkowania strachem.

(a) Myszy podano treningowi warunkowania strachem, podczas którego zaaplikowano im 5 szoków elektrycznych mających na celu wytworzenie reakcji warunkowanego strachu na kontekst, w którym przeprowadzono test. W drugiej części eksperymentu przeprowadzono 3 sesje przypominające, polegające na umieszczeniu myszy w kontekście uprzednio skojarzonym z traumatycznym doświadczeniem. W trakcie treningu oraz sesji przypominających mierzono czas reakcji zastygania. PZM21 (20-40 mg/kg, ip.), morfinę (Morf; 1-20 mg/kg, ip.) lub sól fizjologiczną podawano natychmiast po treningu oraz 1 i 2 sesji przypominającej. **(b)** W trakcie treningu wszystkie grupy nabyły reakcję warunkowanego strachu. **(c-e)** Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w ilości czasu spędzonego na reakcji zastygania. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM.

5. Dane uzupełniające

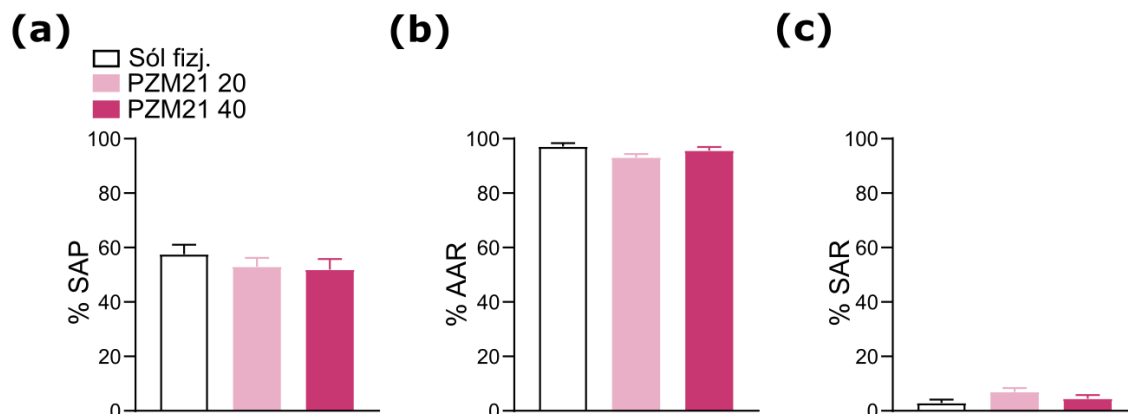
Głównym celem prezentacji danych uzupełniających jest próba odpowiedzi na pytanie o możliwe mechanizmy działania PZM21, który w opisanych wcześniej doświadczeniach cechował się interesującym profilem efektów *in vivo*, ponieważ nie działał nagradzająco, a dane uzyskane w badaniach własnych różniły się od opisanych w oryginalnej publikacji (Manglik i in., 2016). Aby ocenić czy brak działania nagradzającego tego agonisty w teście warunkowanej preferencji miejsca (wymagającym uczenia się) oraz blokowanie nagradzających właściwości morfiny mogą być związane z wpływem PZM21 na poznawcze funkcjonowanie myszy, zbadano wpływ tego związku na pamięć roboczą i konsolidację pamięci w testach labiryntu w kształcie litery Y i rozpoznawania nowego obiektu. Ponadto, podjęto próbę wyjaśnienia braku nagradzających efektów PZM21 za pomocą pomiaru poziomu uwalniania monoamin (dopaminy i serotoniny) z prądkowia myszy, które otrzymały podanie tego związku. Dodatkowo, zaprezentowano wyniki badań *in vitro* dotyczące powinowactwa PZM21 i związków SR do receptorów opioidowych oraz wyniki doświadczenia mierzącego aktywację białka G (wiązanie [³⁵S]GTPγS przez receptor μ), którego intencją było określenie poziomu aktywności wewnętrznej PZM21. W ramach danych dodatkowych opisano także wpływ PZM21, SR-14968 i SR-17018 na pojawienie się tzw. reakcji Strauba.

Wpływ PZM21 na zdolności poznawcze

Labirynt w kształcie litery Y

Test przeprowadzono 30 minut po podaniu ip. PZM21 (20 lub 40 mg/kg) lub soli fizjologicznej (10 ml/kg). Eksplorację labiryntu mierzono przez 5 min, a wyniki wykazały, że podanie PZM21 nie zmienia żadnego ze wskaźników: SAP (ang. *spontaneous alteration performance*) - 3 kolejne wejścia do różnych ramion (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(2,26)}=0,7241$, $p=0,4943$, **Rycina 37a**), AAR (ang. *alternate arm returns*) - 2 kolejne wejścia do różnych ramion (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(2,26)}=2,389$, $p=0,1116$, **Rycina 37b**), SAR (ang. *same arm returns*) - 2 kolejne wejścia do tego samego ramienia (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(2,26)}=2,399$, $p=0,1106$,

(Rycina 37c). Wyniki wskazują zatem, że PZM21 nie zmienia funkcjonowania pamięci roboczej.

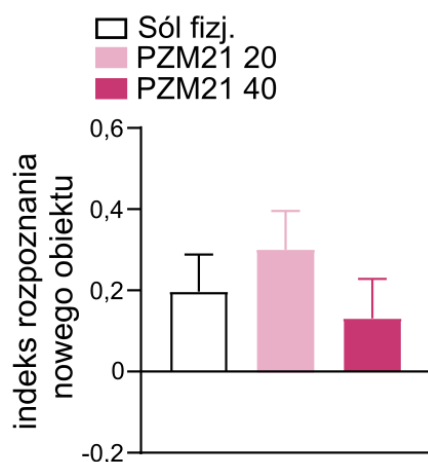


Rycina 37. Wpływ PZM21 na pamięć roboczą w teście labiryntu w kształcie litery Y.

Myszom podano (ip.) PZM21 (20-40 mg/kg) lub sól fizjologiczną 30 minut przed 5-minutową eksploracją labiryntu. Nie odnotowano wpływu agonisty na (a) % SAP, (b) % AAR ani (c) % SAR. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM.

Test rozpoznawania nowego obiektu

Test przeprowadzono wykorzystując takie same grupy jak w teście labiryntu w kształcie litery Y. Badane substancje podano myszom ip. natychmiast po ukończeniu przez nie fazy treningu, co umożliwiło ocenę wpływu PZM21 na konsolidację śladów pamięciowych. Analiza danych wykazała, że podanie PZM21 nie wpływa w sposób istotny na indeks rozpoznania nowego obiektu, co wskazuje, że jego podanie nie zmienia konsolidacji pamięci i funkcjonowania pamięci długotrwałej (jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(2,24)}=0,7903$, $p=0,4651$, **Rycina 38**).

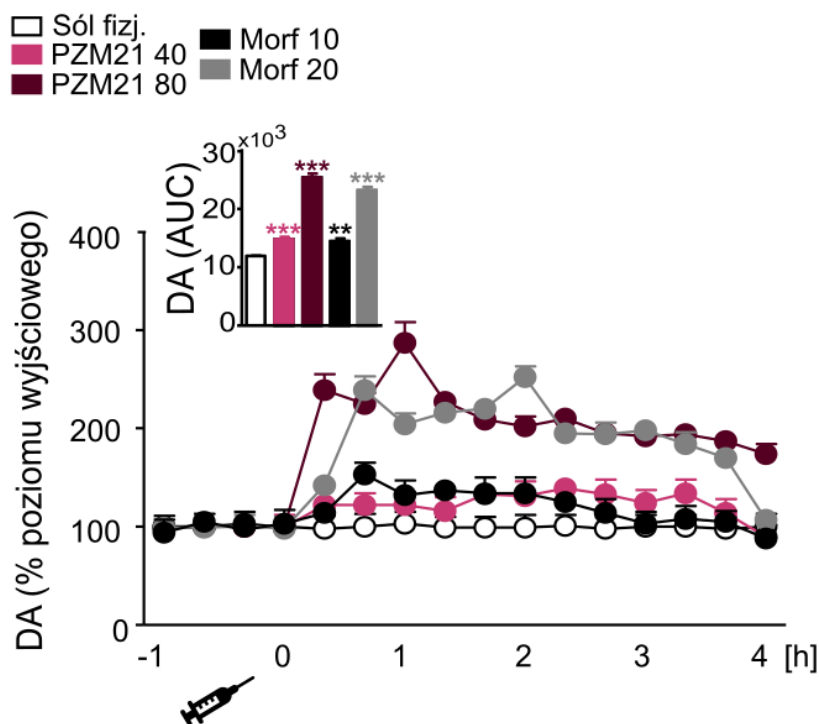


Rycina 38. Wpływ PZM21 na konsolidację pamięci długotrwałej w teście rozpoznawania nowego obiektu.

Myszom podano (ip.) PZM21 (20-40 mg/kg) lub sól fizjologiczną natychmiast po ukończeniu przez nie fazy treningu. Test rozpoznania nowego obiektu przeprowadzono po 24 godzinach. Nie odnotowano wpływu SR na indeks rozpoznania nowego obiektu. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM.

Uwalnianie monoamin z prążkowiecia po jednorazowym podaniu PZM21

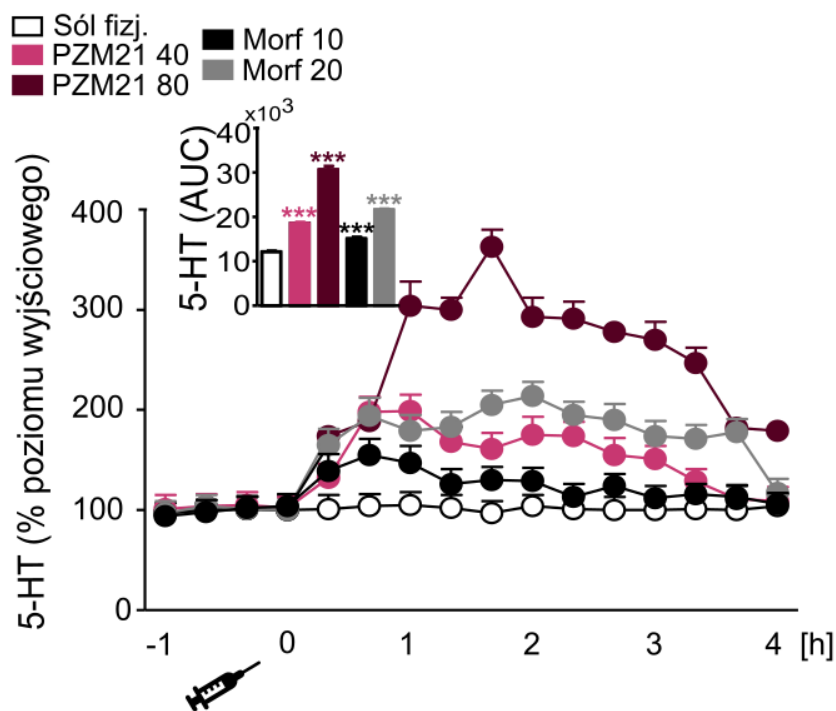
Uwalnianie dopaminy i serotoniny z prążkowiecia zmierzono za pomocą mikrodiatalizy mózgu po jednorazowym podaniu ip. PZM21 (40 i 80 mg/kg), morfiny (10 i 20 mg/kg) lub soli fizjologicznej (10 ml/kg) u swobodnie poruszających się myszy. Analiza poziomu dopaminy w zebranych frakcjach dializatu wykazała, że podane substancje wpływają na uwalnianie dopaminy z prążkowiecia, gdyż odnotowano międzygrupowe różnice w jej poziomie w różnych punktach czasowych (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzаныmi pomiarami: efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(25,275)}=13,001$, $p<0,0001$, **Rycina 39**). Wzrost uwalniania dopaminy wywołany przez dawkę 10 mg/kg morfiny i 40 mg/kg PZM21 osiągnął zbliżony poziom, natomiast efekt wyższej dawki PZM21 (80 mg/kg) był podobny w działania dawki 20 mg/kg morfiny. Działanie PZM21 i morfiny przedstawiono także jako wartość pola pod krzywą (AUC, jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,25)}=175,60$, $p<0,0001$).



Rycina 39. Zewnątrzkomórkowy poziom dopaminy w prążkowieciu po jednorazowym podaniu PZM21.

Uwalnianie dopaminy (DA) zmierzono u myszy za pomocą mikrodiatalizy mózgu. Po zebraniu 3 wyjściowych próbek dializatu w 20-minutowych odstępach (poziom wyjściowy: $3,71 \pm 0,51$ pg/10 μ l), zwierzętom podano ip. PZM21 (40-80 mg/kg), morfinę (Morf; 10-20 mg/kg) lub sól fizjologiczną, po czym dializat zbierano przez kolejne 4 godziny. PZM21 i morfina wpłynęły na wzrost poziomu dopaminy. Wykres przedstawia czasowy przebieg zmian poziomu dopaminy (dla przejrzystości prezentowanych danych nie oznaczono istotności efektów na wykresie). Ponadto otrzymane wartości przedstawiono jako wielkość pola pod krzywą (AUC). Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ (test Bonferroniego, porównanie do grupy, która otrzymała sól fizjologiczną).

W tych samych warunkach eksperymentalnych zmierzono także wpływ substancji na poziom serotoniny. Analiza danych wykazała międzygrupowe różnice jej poziomu w różnych punktach czasowych (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami: efekt interakcji (grupa x czas: $F_{(25,275)}=17,221$, $p<0,0001$, **Rycina 40**). Dawka 40 mg/kg PZM21 spowodowała zewnątrzkomórkowy wzrost serotoniny w prążkowie, który był podobny do efektów obu dawek morfiny. Wyższa dawka PZM21 (80 mg/kg) spowodowała natomiast bardzo silne uwalnianie serotoniny, sięgające ponad 350% poziomu podstawowego w najwyższym punkcie. Dane przedstawiono także jako wartość pola pod krzywą (AUC, jednoczynnikowa ANOVA: $F_{(4,25)}=275,30$, $p<0,0001$).



Rycina 40. Zewnątrzkomórkowy poziom serotoniny w prążkowie po jednorazowym podaniu PZM21.

Uwalnianie serotoniny (5-HT) zmierzono u myszy za pomocą mikrodializy mózgu. Po zebraniu 3 wyjściowych próbek dializatu w 20-minutowych odstępach (poziom wyjściowy: $0,40 \pm 0,06$ pg/10 μ l), zwierzętom podano ip. PZM21 (40-80 mg/kg), morfinę (Morf; 10-20 mg/kg) lub sól fizjologiczną, po czym dializat zbierano przez kolejne 4 godziny. PZM21 i morfina wpłynęły na wzrost poziomu serotoniny. Wykres przedstawia czasowy przebieg zmian poziomu serotoniny (dla przejrzystości prezentowanych danych nie oznaczono istotności efektów na wykresie). Ponadto otrzymane wartości przedstawiono jako wielkość pola pod krzywą (AUC). Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM, *** $p<0,001$ (test Bonferroniego, porównanie do grupy, która otrzymała sól fizjologiczną).

Powinowactwo PZM21, SR-14968 i SR-17018 do receptorów opioidowych

Powinowactwo PZM21, SR-14968 oraz SR-17018 do receptorów opioidowych μ , κ i δ wykorzystując metodę znakowanego radioaktywnie liganda. Jako związki referencyjne o wysokim powinowactwie do wybranego typu receptorów opioidowych wykorzystano DAMGO (dla receptora μ), naltrindol (dla receptora δ) oraz U-69593 (dla receptora κ). Wartości stałej inhibicji (K_i) opisującej powinowactwo wiązania cząsteczek do receptora przedstawiono w **Tabeli 6**. Wynika z nich, że PZM21, SR-14968 i SR-17018 wykazują silne powinowactwo do receptora μ (odpowiednio: 3, 24 i 34 nM). Ponadto, PZM21 posiada także wysokie powinowactwo (22 nM) do receptora κ , co może mieć istotne znaczenie dla interpretacji jego niektórych efektów behawioralnych.

Tabela 6. Powinowactwo badanych agonistów do receptorów opioidowych.

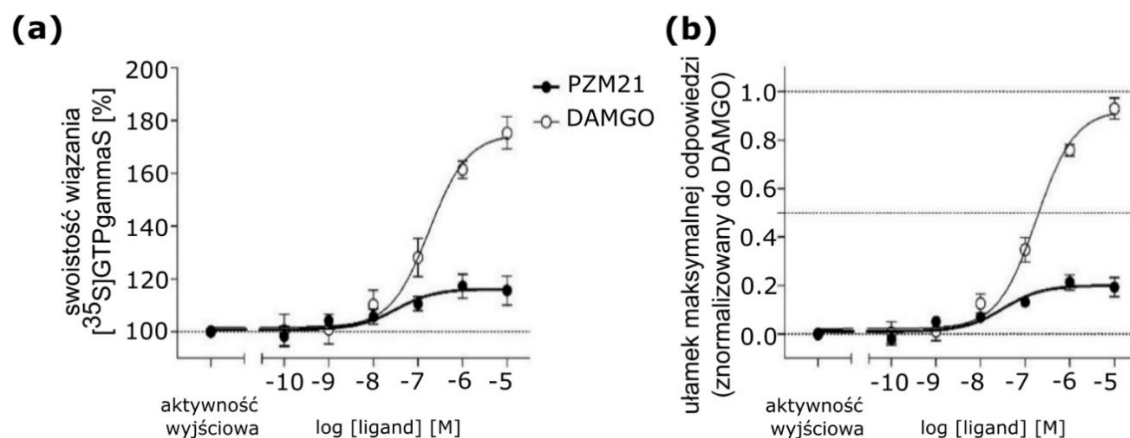
	K_i [nM]		
	μ	δ	κ
DAMGO	1	-	-
Naltrindol	-	0,7	-
U-69593	-	-	1,6
PZM21	3	1634	22
SR-14968	24	>10000	>10000
SR-17018	34	>10000	2285

Aktywacja białka G wywołana przez PZM21

Aktywację białka G przez PZM21 zmierzono w teście wiązania [35 S]GTP γ S w porównaniu do DAMGO, prototypowego agonisty receptora μ . Doświadczenie przeprowadzono dzięki współpracy z badaczami z Szeged Biological Research Centre (Węgry).

Wyniki pomiarów (przedstawionych jako % swoistości wiązania [35 S]GTP γ S, **Rycina 41a** oraz ułamek maksymalnej odpowiedzi znormalizowany do DAMGO, **Rycina 41b**) wskazują, że PZM21 w niskim stopniu aktywuje białko G (ok. 16 %

maksymalnej odpowiedzi), co wskazuje na niską aktywność wewnętrzną tego agonisty (częściowy agonizm). Parametry krzywych przedstawiono w **Tabeli 7**.



Rycina 41. Aktywacja białka G przez PZM21 w teście wiązania $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$.

Testy wiązania przeprowadzono w homogenatach błon komórkowych z mózgow szczurów. **(a)** Dane przedstawiają % swoistości wiązania $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ w stosunku do aktywności podstawowej (100%) w obecności rosnących stężeń PZM21 lub DAMGO dla kontroli. **(b)** Dane przedstawiają ułamek maksymalnej odpowiedzi (=1) PZM21 znormalizowanego do DAMGO w obecności rosnących stężeń PZM21 lub DAMGO. Rycina wskazuje poziom połowy maksymalnej odpowiedzi (0,5) linią przerywaną. Na obu wykresach „aktywność wyjściowa” na osi x wskazuje całkowite specyficzne wiązanie $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ pod nieobecność związków, które zostało ustalone jako 100% lub 0 (wskazane linią przerywaną), a także reprezentuje monitorowaną aktywność podstawową białka G. Dane prezentowane są jako wartości średnie \pm SEM dla przynajmniej 3 eksperymentów przeprowadzonych w 2 powtórzeniach.

Tabela 7. Aktywacja białka G przez PZM21 w teście wiązania $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$.

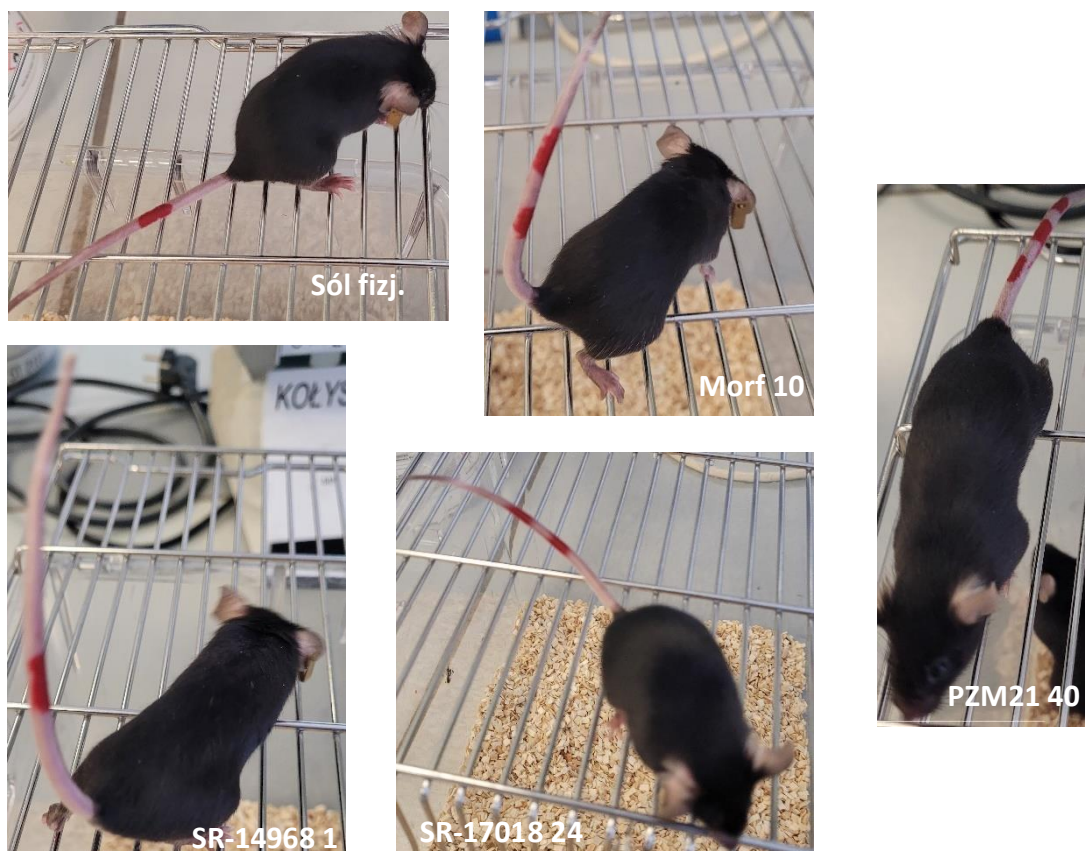
	logEC ₅₀ \pm SEM (M) (EC ₅₀ , nM)	E _{max} \pm SEM	
		(%)	(ułamek znormalizowany do DAMGO)
PZM21	-7,49 \pm 0,29 (32,4)	116,2 \pm 1,5	0,19 \pm 0,02
DAMGO	-6,74 \pm 0,09 (179,1)	174,8 \pm 2,8	0,92 \pm 0,03

Reakcja Strauba

Występowanie reakcji Strauba obserwowano u myszy po jednorazowym podaniu ip. PZM21 (40 mg/kg), SR-14968 (1 mg/kg), SR-17018 (24 mg/kg) lub soli fizjologicznej. Przykładowe zdjęcia zwierząt po otrzymaniu odpowiednich substancji przedstawiono na **Rycinie 42**. Zgodnie z przewidywaniami, podanie morfiny (10 mg/kg) wywoływało silną reakcję Strauba. Podobny efekt miał miejsce po podaniach

Wyniki

SR-14968 (1 mg/kg). Z kolei PZM21 (40 mg/kg) i SR-17018 (24 mg/kg) nie wywoływały tej reakcji. Na podstawie tych obserwacji wydaje się, że z badanych substancji najbardziej przypominającą morfinę jest SR-14968.



Rycina 42. Wpływ jednorazowego podania badanych substancji na występowanie reakcji Strauba.

Myszom podano (ip.) PZM21 (40 mg/kg), SR-14968 (1 mg/kg), SR-17018 (24 mg/kg), morfinę (Morf; 10 mg/kg/10 ml) lub sól fizjologiczną i obserwowano wystąpienie reakcji Strauba. Widoczna reakcja Strauba wystąpiła u zwierząt, które otrzymały podania SR-14968 lub morfiny. Rycina przedstawia przykładowe zdjęcia myszy wykonane 1 godzinę po podaniu.

6. Zestawienie uzyskanych wyników

Wyniki uzyskane w przeprowadzonych eksperymentach przedstawiono zbiorczo w Tabeli 8.

Tabela 8. Zestawienie uzyskanych wyników.

Badany aspekt	PZM21	SR-14968	SR-17018
Antynocycpcja	zależna od dawki, utrzymująca się min. 4 godziny, efekt pułapowy;	zależna od dawki, utrzymująca się min. 8 godzin, osiągająca możliwe maksimum;	
Tolerancja na działanie antynocycptywne	występuje, rozwija się szybko;	występuje, rozwija się z nieznacznym opóźnieniem;	
Zależność fizyczna (zespół odstawienia)	występuje jedynie w odpowiedzi na najwyższą testowaną dawkę agonisty;	występuje w odpowiedzi na niskie/umiarkowane dawki;	
Aktywność lokomotoryczna po jednorazowym podaniu	brak zmian;	nasilenie;	brak zmian;
Aktywność lokomotoryczna w trakcie podań wielokrotnych	brak zmian, ekspresja aktywności po okresie inkubacji w odpowiedzi na najwyższą testowaną dawkę agonisty;	tolerancja efektu nasilonej aktywności z pierwszego dnia doświadczenia, wysoka ekspresja aktywności po okresie inkubacji;	brak zmian, tendencja w kierunku ekspresji aktywności po okresie inkubacji;
Efekty nagradzające (warunkowana preferencja miejsca)	brak, w przypadku najwyższej testowanej dawki tendencja w kierunku awersji;	efekty nagradzające występują;	
Efekty wzmacniające (samopodawanie i poszukiwanie substancji w okresie abstynencji)	brak efektów	-	-

Wyniki

Wpływ na antynocycyptywny efekt morfiny	nasilenie efektów morfiny;	tendencja w kierunku nasilenia efektów morfiny;	
Rozwój tolerancji na antynocycyptę morfinową	brak wpływu;	tendencja w kierunku spowolnienia rozwoju tolerancji;	
Nasilenie zespołu odstawienia u myszy uzależnionych fizycznie od morfiny	słabe działanie hamujące jedynie obwodowe objawy odstawienia;	tendencja w kierunku hamowania objawów odstawienia;	hamowanie objawów odstawienia;
Nagradzające właściwości morfiny (warunkowana preferencja miejsca)	osłabianie nagradzających efektów morfiny;	-	-
Odpowiedź na ostry stres	brak wpływu;	-	-
Zachowania lękowe	nasilenie lękowości;	-	-
Pamięć związana ze strachem (warunkowanie strachem)	brak wpływu;	-	-
Zdolności poznawcze	brak wpływu;	-	-
Zewnątrzkomórkowy poziom dopaminy i serotoniny w prążkowie	wzrost zewnątrzkomórkowego poziomu monoamin w prążkowie;	-	-
Reakcja Strauba	brak efektu;	występuje;	brak efektu;

Dyskusja

1. Antynocyceptywne działanie funkcjonalnie selektywnych agonistów receptora opioidowego μ

Działanie selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ , PZM21, SR-14968 i SR-17018, zbadano w testach mierzących wrażliwość na bólowy bodziec termiczny. Zastosowano dwa testy behawioralne, tj. odsuwania ogona i gorącej płytki. Antynocyceptywne działanie PZM21 zbadano u myszy po podaniu ip. w zakresie dawek 20-80 mg/kg. W teście odsuwania ogona PZM21 wywołał zależną od dawki i długotrwałą, utrzymującą się co najmniej 4 godziny, antynocycepcję. Rozwijała się ona stosunkowo wolno, ponieważ, zależnie od dawki, największy efekt zaobserwowano 2 lub 4 godziny po podaniu substancji. Co interesujące, PZM21 osiągnął efekt pułapowy/sufitowy (ang. *ceiling effect*), gdyż zwiększanie dawki (z 40 na 80 mg/kg) nie nasiliło istotnie antynocycepcji. Żadna z zastosowanych dawek nie umożliwiła także osiągnięcia maksymalnej możliwej odpowiedzi w teście (100% MPE). Działanie to jest charakterystyczne dla niektórych częściowych agonistów receptorów opioidowych (Trescot i in., 2008). W teście gorącej płytki zastosowano analizę zaproponowaną przez Manglika i in. (2016). Rozróżnili oni dwa rodzaje zachowań – pierwszy polegał na odsuwaniu/potrząsaniu łapą, a drugi na lizaniu łapy/skokach. Autorzy tej pracy sugerowali, że pierwszy typ reakcji przebiega na poziomie odruchów rdzeniowych, a drugi, mający podłoże emocjonalne, wymaga zaangażowania wyższych struktur ośrodkowych, w tym układu limbicznego. Także w tym teście zaobserwowano antynocyceptywne działanie PZM21, chociaż było ono słabsze niż w teście odsuwania ogona i dla większości dawek nie osiągnęło progu istotności statystycznej. Wyniki badań własnych częściowo różnią się od opisanych w pracy Manglika i in. (2016). Autorzy tej pracy sugerowali, że PZM21 nie wywołuje antynocycepcji na poziomie rdzeniowym (w teście odsuwania ogona), lecz efektywnie osłabia jedynie „afektywny” aspekt reakcji bólowej, który możliwy był do zbadania w teście gorącej płytki. W badaniach własnych zastosowano szerszy zakres dawek (w publikacji Manglika i in. (2016) test odsuwania ogona przeprowadzony

Dyskusja

został po podaniu dawek 10-20 mg/kg), co pozwoliło na wykazanie działania PZM21 w teście odsuwania ogona. Charakterystyczne dla PZM21 jest natomiast występowanie efektu pułapowego, co wskazuje, że ten działa on jak częściowy agonista receptora μ . Aby jednoznacznie potwierdzić, że PZM21 działa przeciwbólowo na poziomie rdzenia kręgowego, w dodatkowym eksperymencie wykazano, że nardzeniowe podanie tego agonisty szczerom także ma podobny efekt. Alternatywnym wyjaśnieniem dla różnic między wynikami własnymi a dostępnymi w oryginalnej publikacji mogą być także różnice w rozpuszczalności PZM21, jednak nie była to kwestia szerzej badana. Dodatkowo, przy użyciu selektywnego antagonisty receptora μ , cyprodime, wykazano, że antynocyceptywne działanie PZM21 jest zależne od aktywacji tego receptora. Późniejsze badania innych autorów, przeprowadzone na rebusach, także potwierdziły, że PZM21 ma działanie antynocyceptywne w odpowiedzi na termiczny bodziec bólowy. Ponadto, wykazano w nich, że PZM21 skutecznie osłabia allodynię wywołaną kapsaicyną (Ding i in., 2020). Z kolei Gillis i in. (2020a) przy wykorzystaniu testu gorącej płytki także udowodnili, że PZM21 ma działanie antynocyceptywne, jednak podobnie jak w badaniach zaprezentowanych w rozprawie, nie osiągało ono wartości maksymalnej, pomimo że autorzy zastosowali dawki agonisty sięgające 100 mg/kg.

Antynocyceptywne działanie związków SR badano w sposób analogiczny jak efekty PZM21. SR-14968 (0,3-3 mg/kg) i SR-17018 (8-24 mg/kg) wywoływały zależną od dawki antynocycepcję, zarówno w teście odsuwania ogona, jak i w teście gorącej płytki. Działanie to było długotrwałe, ponieważ utrzymywało się nawet do 24 godzin. Pozostaje to w zgodzie się z danymi Schmid i in. (2017), które wskazywały na długotrwałą obecność związków SR w osoczu i tkance mózgowej. Co istotne, po podaniu najwyższej testowanej dawki SR-14968 (3 mg/kg) obserwowano efekty toksyczne, przejawiające się pogorszeniem stanu zdrowia zwierząt w 2/3 doby od podania agonisty. Stwierdzono około 30% śmiertelność zwierząt, które otrzymały związek w tej dawce. Jak wynika z własnych obserwacji oraz opublikowanych badań (Schmid i in., 2017), śmiertelność nie była efektem wpływu tej dawki agonisty na ośrodek oddechowy. Bardziej prawdopodobne wydaje się, że padnięcia były związane z wyczerpaniem myszy i odwodnieniem wynikającym z silnego pobudzenia lokomotorycznego po podaniu wysokiej dawki substancji, ponieważ następowały po upływie minimum doby od podania. Z kolei w przypadku SR-17018 problemem

Dyskusja

okazała się słaba rozpuszczalność związku, co znacząco utrudniało prowadzenie doświadczeń w przypadku stężeń przekraczających $\sim 2,5$ mg/ml. Do kolejnych doświadczeń wybrano zatem dawki 24 mg/kg SR-17018 i 1 mg/kg SR-14968, których podanie skutkowało osiągnięciem poziomu $\sim 80\%$ MPE w teście odsuwania ogona. Niemniej, wyniki badań własnych potwierdzają silne działanie antynocyceptywne SR-14968 i SR-17018. Podobne dane wskazujące na efektywność antynocyceptywną obu agonistów przy zastosowaniu zbliżonych dawek opublikowało kilka zespołów (Grim i in., 2020; Pantouli i in., 2021; Schwienteck i in., 2019). Do tej pory, więcej uwagi poświęcono SR-10718, gdyż ostatnio przebadano tego agonistę nie tylko pod kątem wpływu na podstawową wrażliwość bólową, lecz także oceniono jego efektywność w zwierzęcych modelach bólu zapalnego i neuropatycznego, w których okazał się skuteczny (Pantouli i in., 2021).

Podsumowując tę część badań, wykazano, że funkcjonalnie selektywni agoniści receptora μ , PZM21, SR-14968 i SR-17018, wykazują typowe dla innych agonistów tego receptora działanie przeciwbólowe. W porównaniu do morfiny, badani agoniści cechują się długotrwałym działaniem antynocyceptywnym, które rozwija się wolniej i później osiąga wartość maksymalną. Choć z punktu widzenia użyteczności klinicznej wolno rozwijające się działanie przeciwbólowe może być niekorzystne, ponieważ od leków przeciwbólowych oczekuje się zazwyczaj szybkiego działania, to fakt, że efekt ten utrzymuje się przez wiele godzin, jest cenną właściwością badanych związków.

Warto zaznaczyć, że jeden z selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ , TRV130 (olicerydyna), został dopuszczony do leczenia bólu ostrego w Stanach Zjednoczonych, co wskazuje na istotny kliniczny potencjał związków z tej grupy (FDA, 2020). Do tej pory TRV130 pozostaje też najlepiej przebadanym stronniczym agonistą receptora μ . Testy na zwierzętach wykazały jego skuteczność w zwiększaniu proggu reakcji na bodźce nocyceptywne, a także w przeciwdziałaniu allodynii pojawiającej się w przebiegu bólu pooperacyjnego (DeWire i in., 2013). Istotnym problemem klinicznym jest także ból neuropatyczny, którego leczenie jest dużym wyzwaniem dla lekarzy, ponieważ jego pochodzenie i objawy są złożone i różnorodne. Konwencjonalni agoniści receptora μ są zazwyczaj słabo efektywni w farmakoterapii neuropatii (Martinez-Navarro i in., 2018), dlatego interesującym zagadnieniem jest ocena efektywności przeciwbólowej selektywnych funkcjonalnie agonistów tego

receptora w modelach bólu neuropatycznego. Obecnie wiadomo jedynie, że SR-17018 wykazywał skuteczność (także w trakcie podań wielokrotnych) w modelu neuropatii wywoływanej chemioterapią (Pantouli i in., 2021).

Przeprowadzone badania własne miały charakter eksploracyjny i wykorzystano w nich zdrowe gryzonie, u których nie rozwinięto stanów bólowych. Z pewnością wszystkie te związki powinny zostać w przyszłości gruntownie przebadane w modelach przewlekłego bólu o różnym pochodzeniu, w tym w neuropatii.

2. Wpływ badanych agonistów na zachowania związane z uzależnieniem

Ryzyko rozwoju uzależnienia jest jednym z najpoważniejszych skutków ubocznych stosowania opioidów (Wang i in., 2019). Stanowi poważny problem medyczny, społeczny i ekonomiczny (Degenhardt i in., 2019), dlatego też wszystkie nowe opioidowe substancje chemiczne ocenia się również pod tym kątem.

W niniejszej pracy badano zachowania charakterystyczne dla zależności fizycznej (ang. *physical dependence*) od substancji, z którą wiąże się występowanie zespołu odstawienia w następstwie zaprzestania dostarczania opioidu. Jest to reakcja cechująca się charakterystycznymi objawami: m.in. biegunką, przyśpieszonym pulsem, zwiększoną potliwością, poczuciem niepokoju. Z klinicznego punktu widzenia, zespół odstawienia jest jednym z najsilniejszych czynników napędzających uzależnienie (Kosten i George, 2002). Zależność fizyczna wiąże się z rozwojem tolerancji na opioidy i występuje jedynie u osobników, u których tolerancja się rozwinęła. Tolerancja manifestuje się potrzebą przyjmowania coraz wyższych dawek substancji w celu osiągnięcia pożądaných efektów, natomiast wynika ze spadku wrażliwości receptorów na agonistów opioidowych.

W badaniach uwzględniono także pomiar aktywności lokomotorycznej po podaniu PZM21, SR-14968 i SR-17018, ponieważ nasilenie tej aktywności w wyniku podań wyższych dawek agonistów receptora μ uważane jest za zjawisko zależne od dopaminy (Saito, 1990). Z kolei sensytyzacja lokomotoryczna, czyli stopniowy wzrost aktywności motorycznej zwierząt w trakcie wielokrotnych podań substancji psychoaktywnych, związana jest z sensytyzacją obszarów odpowiedzialnych za zachowania motywacyjno-popędowe. Kostowski (2005) pisze o sensytyzacji jako

o mającej związek z uzależnieniami przez to, że współwystępuje z działaniem nagradzającym i wzmacniającym oraz angażuje te same układy neuronalne. Zjawisko sensytyzacji związane jest z teorią definiującą uzależnienie jako tzw. sensytyzację zachęt (ang. *incentive sensitization*). Zgodnie z nią, proces uzależnienia jest następstwem postępujących zmian neuroadaptacyjnych, polegających na sensytyzacji obszarów mózgu odpowiedzialnych za pożądanie nagrody (Robinson i Berridge, 1993; Zwierzyńska i Pietrzak, 2014). Test warunkowanej preferencji miejsca umożliwił natomiast ocenę nagradzających właściwości badanych agonistów, co stanowi miarę „subiektywnych” efektów działania tych związków u zwierząt (McKendrick i Graziane, 2020). W przypadku PZM21 doświadczenia uzupełniono wykorzystaniem modelu dożylnego samopodawania substancji, który pozwala na wnioskowanie o wpływie związków na wzrost motywacji do kontynuacji ich dostarczania, wynikającej z ich wzmacniających efektów (Green i Bardo, 2020).

Wpływ selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ na wymienione zachowania związane z uzależnieniem przedyskutowano w poniższych podrozdziałach.

Tolerancja na działanie antynocyceptywne

Wiele doniesień, w tym pierwsze badania zespołu Bohn na myszach z nokautem β -arr2 sugerowało, że ograniczenie sygnalizacji zależnej od tego białka może zahamować rozwój tolerancji na antynocyceptywne działanie morfiny (Bohn i in., 2000; Przewłocka i in., 2002; Raehal i Bohn, 2011; Yang i in., 2011). Wpływ selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ na rozwój tolerancji budzi więc duże zainteresowanie. Zasadna wydawała się hipoteza, że związki o takim profilu działania mogą nie powodować szybkiego rozwoju tolerancji.

Wyniki uzyskane w badaniach przedstawionych w rozprawie wykazały jednak, że w wyniku wielokrotnych podań PZM21 następuje szybki rozwój tolerancji w teście odsuwania ogona. Rezultat ten jest zgodny z danymi opublikowanymi przez Hilla i in. (2018), które także wskazały na szybki rozwój tolerancji, która w tym przypadku badana była w teście gorącej płytki. Nie ulega więc wątpliwości, że PZM21 wywołuje tolerancję w testach mierzących reakcję na termiczny bodziec nocyceptywny. Z kolei w doświadczeniu badającym wpływ SR-14968 i SR-17018 na

rozwój tolerancji wykazano, że wielokrotne podania tych agonistów także prowadzą do tolerancji, chociaż rozwija się ona wolniej niż w przypadku PZM21. Wyraźny spadek efektywności agonistów odnotowano dopiero pomiędzy 5 a 7 dniem podań, podczas gdy PZM21 wywoływał tolerancję już w 3 dniu doświadczenia. Można zatem założyć, że w porównaniu do morfiny (a także do PZM21), tolerancja na antynocyceptywne działanie związków SR-14968 i SR-17018 rozwija się z niewielkim opóźnieniem. Grim i in. (2020) wykazali, że SR-17018 nie wywołuje rozwoju tolerancji w teście gorącej płytki. W tym samym badaniu chroniczne podania tego agonisty nie prowadziły też do desensytyzacji receptorów μ w istocie szarej okołowodociągowej. Pantouli i in. (2021) badali natomiast wpływ wielokrotnie podawanego SR-17018 na rozwój tolerancji w termicznym teście zanurzania ogona, w którym stwierdzili rozwój tolerancji na antynocyceptywne działanie tego związku. Wyniki tych badań są spójne z rezultatami badań własnych, ponieważ wskazują, że rozwój tolerancji na działanie SR-17018 mierzony w termicznych testach odsuwania oraz zanurzania ogona u myszy z pewnością występuje, nawet jeśli jest nieznacznie opóźniony. Interesującą obserwacją jest natomiast, że Grim i in. (2020) nie obserwowali tolerancji na SR-17018 w teście gorącej płytki, a Pantouli i in. (2021) nie odnotowali jej w mysich modelach bólu zapalnego i neuropatycznego. Zagadnienie wymaga więc dalszych badań, bo otwarte pozostaje pytanie, czy rozwój tolerancji na działanie SR-17018 zachodzi różnie na poziomie rdzeniowym i ponadrdzeniowym.

Wyniki badań własnych nie popierają raczej hipotezy Bohn i in. (2000) o kluczowej roli β -arr2 w powstawaniu tolerancji antynocyceptywnej, ponieważ ograniczenie rekrutacji β -arr2 nie pozwoliło uniknąć tolerancji na efekty badanych związków. Co ciekawe, w badaniach Bohn i in. (2020), u myszy z nokautem β -arr2 nie rozwijała się tolerancja, którą mierzono w teście gorącej płytki. Istnieje więc możliwość, że wykluczenie szlaku β -arr2 zapobiega jedynie tolerancji w teście gorącej płytki, podczas gdy ma ograniczony wpływ na tolerancję w testach mierzących odruchowe reakcje rdzeniowe (test odsuwania/zanurzania ogona), co zaobserwowano w badaniach własnych. Oznaczałoby to, że ocena tolerancji może zależeć od rodzaju stanu bólowego, a także użytego w badaniu testu. Nie wydaje się to aktualnie wystarczającym wytłumaczeniem rozbieżności wyników, ale z pewnością podkreśla wagę rygoru metodologicznego w prowadzeniu badań behawioralnych.

Alternatywnym wyjaśnieniem wyników jest poziom aktywności wewnętrznej (ang. *intrinsic activity*) badanych agonistów, czyli zdolność kompleksu agonista-receptor do wytworzenia maksymalnej odpowiedzi funkcjonalnej. Efekty agonistów opioidowych o wysokiej aktywności wewnętrznej (tzw. pełnych agonistów) są mniej podatne na rozwój tolerancji (Christie i in., 1987; Madia i in., 2009; Stevens i Yaksh, 1989). Jest to związane z tym, że pełni agoniści wymagają mniejszych rezerw receptorowych, aby w trakcie podań przewlekłych dłużej zachowywać skuteczność przeciwbólową. PZM21 wywoływał efekt pułapowy w teście odsuwania ogona, a więc wykazywał cechy częściowego agonisty. Ponadto, równolegle do prowadzonych badań ukazały się publikacje, których autorzy jednoznacznie wskazywali na częściowy agonizm (niską aktywność wewnętrzną) PZM21 (Gillis i in., 2020a; Hill i in., 2018; Yudin i Rohacs, 2019). Do podobnych wniosków prowadzą wyniki wiązania [³⁵S]GTPγS zaprezentowane w rozprawie. W tym kontekście szybki rozwój tolerancji na antynocyceptywne działanie PZM21 wydaje się uzasadniony. Z kolei związki SR-14968 i SR-17018, których efekty były mniej podatne na tolerancję, wydają się mieć raczej wysoką aktywność wewnętrzną, na co wskazuje zależna od dawki i osiągająca maksimum antynocycepcja. Jedynie Gillis i in. (2020a) sugerowali, że SR-17018 może być częściowym agonistą receptora μ , co jednak nie znajduje potwierdzenia w wynikach badań własnych, a może być związane z przygotowaniem i rozpuszczalnością związku.

Rozwój tolerancji antynocyceptywnej wywoływanej przez selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ wciąż pozostaje kwestią sporną, gdyż brakuje ostatecznych dowodów na kluczową rolę β -arr2 w powstawaniu tolerancji. Znaczenie tego białka w mechanizmach desensytyzacji i internalizacji receptorów nie budzi wątpliwości, jednak zmiany adaptacyjne zachodzące w wyniku niemal całkowitego wykluczenia zależnej od β -arr2 ścieżki sygnałowej nie są jeszcze poznane. Zgodnie z najnowszymi danymi opublikowanymi przez zespół Bohn, SR-14968 i SR-17018 są niekompetywnymi agonistami receptora μ , które stabilizują receptor w aktywnym stanie (Stahl i in., 2021). Wiążą się oni do receptora niemal nieodwracalnie i stabilizują jego aktywny stan, prowadząc do długotrwałej sygnalizacji zależnej od białka G. Sygnalizacja ta może jednak wciąż zostać zablokowana przez ortosterycznych antagonistów, co sugeruje, że związki te wiążą się z wysokim powinowactwem do innego miejsca w receptorze i mogą działać częściowo jako

allosteryczni agoniści. Autorzy cytowanej pracy postawili hipotezę, że ta właśnie właściwość agonistów SR ma bezpośredni związek z ich selektywnością funkcjonalną i przekłada się ich przedłużone działanie *in vivo* oraz osłabioną tolerancję. Z drugiej strony, w ostatnim czasie pojawiły się także interesujące doniesienia sugerujące przeciwny niż ten postulowany przez zespół Bohn, kierunek wpływu β -arr2 na rozwój tolerancji opioidowej. Zespół Whistler (He i in., 2021) opublikował pracę, w której badano działanie sześciu różnych agonistów receptora μ o różnym współczynniku selektywności funkcjonalnej wobec ścieżek sygnałowych zależnych od białka G oraz β -arr2. Efekty tych agonistów badano u modyfikowanych genetycznie myszy, które różnicowały się pod kątem zdolności wiązania β -arr2 do receptora aktywowanego przez morfinę. Wyniki otrzymane w tym badaniu sugerują, że efektywna rekrutacja β -arr2 raczej osłabia niż zwiększa ryzyko rozwoju tolerancji. Myszy, u których rekrutacja β -arr2 była większa niż w grupie kontrolnej, charakteryzowały się istotnie opóźnionym rozwojem tolerancji na morfinę, co zinterpretowano jako dowód na pozytywną rolę β -arr2 w przeciwdziałaniu tolerancji.

Jak wynika z przytoczonych przykładów, znaczenie selektywności funkcjonalnej dla rozwoju tolerancji na przeciwbólowe działanie agonistów receptora μ pozostaje kwestią otwartą. Badania przeprowadzone na modelach transgenicznym przyniosły bardzo zróżnicowane wyniki. Z kolei badania *in vivo* agonistów stronniczych wobec białka G także nie wykazały jednoznacznej przewagi tych ligandów nad związkami działającymi za pośrednictwem obu ścieżek sygnałowych. W badaniach własnych SR-14968 i SR-17018 cechowali się lekko opóźnionym rozwojem tolerancji, ale pozostaje pytanie, czy tak niewielki efekt mieć znaczenie kliniczne.

Zależność fizyczna i zespół odstawienia

PZM21, SR-14968 oraz SR-17018 oceniono także pod kątem ich wpływu na rozwój zależności fizycznej. Pomiar objawów odstawienia (precypitowanych naloksonem) poprzedzony chronicznymi podaniami stałych dawek agonistów pozwolił stwierdzić, że PZM21 wywołuje słabą zależność fizyczną, ponieważ objawy odstawienia występowały jedynie w grupie myszy, które otrzymywały najwyższą dawkę tego agonisty (80 mg/kg). Mając na uwadze działanie PZM21 w testach nocycetywnych można przyjąć, że PZM21 wywołuje słabą zależność fizyczną

Dyskusja

dawkach wystarczających do wywołania antynocycepcji. Przeciwnie, agoniści SR, a szczególnie SR-14968, posiadają wysoki potencjał do wywoływania zależności fizycznej. Ilościowe przedstawienie objawów wskazuje, że nasilenie odstawienia w grupie SR-14968 było dwukrotnie większe niż w grupach otrzymujących SR-17018 lub morfinę, pomimo tego, że z powodu wysokiego ryzyka przedawkowania SR-14968, w schemacie wielokrotnych podań wykorzystano jedynie najniższą z badanych dawek tego związku (0,3 mg/kg). Równolegle w literaturze pojawiły się dane świadczące o wywoływaniu zależności fizycznej przez SR-17018 (Grim i in., 2020). Autorzy obserwowali objawy spontanicznego odstawienia u myszy otrzymujących chroniczne podania tego agonisty, co jest zgodne z wynikami przedstawionymi w niniejszej rozprawie i nie pozostawia wątpliwości, że podania SR-17018 skutkują rozwojem silnej zależności fizycznej i zespołu odstawienia.

Badania przeprowadzone na myszach z nokautem β -arr2 wskazały, że zespół odstawienia od morfiny u tych zwierząt był niezmieniony lub jedynie lekko osłabiony w przypadku stosowania bardzo niskiej dawki opioidu (Raehal i Bohn, 2011). Brak wpływu β -arr2 na zespół odstawienia od morfiny i fentanylu został również potwierdzony u myszy wyrażających zmodyfikowany receptor μ , co zapobiegało fosforylacji receptora i wiązaniu β -arr2 (Kliwer i in., 2019). Wydaje się zatem, że osłabienie rekrutacji β -arr2 w następstwie aktywacji receptora μ nie ma bezpośredniego przełożenia na potencjał agonisty do wywoływania zależności fizycznej i związanego z nią zespołu odstawienia. Zgodnie z tym, agoniści SR wywołują zależność fizyczną. PZM21 cechuje natomiast stosunkowo niskie prawdopodobieństwo powodowania tego rodzaju symptomów, przynajmniej w efektywnych, antynocyceptywnych dawkach. Częściowo może być za to odpowiedzialna niska aktywność wewnętrzna tego agonisty. Buprenorfina, która jest częściowym agonistą receptora μ także ma niższy potencjał do wywoływania zależności fizycznej niż pełni agoniści tego receptora (Kumar i in., 2021). Z drugiej strony wiadomo, że istnieją inni agoniści receptora μ charakteryzujący się selektywnością funkcjonalną wobec białka G, którzy także nie wywołują silnej zależności fizycznej. Są to m.in. niektóre alkaloidy kratomu (Váradi i in., 2016; Wilson i in., 2021). Należy mieć jednak na uwadze, że związki te, a także przywołana powyżej buprenorfina, posiadają jeszcze powinowactwo do innych receptorów opioidowych, więc mechanizmy ich działania mogą być bardziej złożone.

Podsumowując ten etap badań, uzyskane wyniki wskazują na pewną przewagę PZM21 nad agonistami SR w aspekcie wywoływania zależności fizycznej. Chroniczne podawanie myszom dawki 40 mg/kg PZM21 nie prowadziło do rozwoju zespołu odstawienia. Jest to interesująca cecha tego agonisty, która jednak może nie być bezpośrednio związana z jego stroniczością wobec białka G. Ta sama dawka PZM21 wywoływała jednocześnie szybką tolerancję, stąd wydaje się wątpliwe, aby brak wpływu na zależność fizyczną miał istotne znaczenie kliniczne. Z drugiej strony, zaobserwowano wysoki potencjał wywoływania zależności fizycznej przez agonistów SR, a szczególnie SR-14968. Jest to poważne działanie niepożądane tych związków i z pewnością powinno być brane pod uwagę w rozważaniach nad ich ewentualnym wprowadzeniem do badań klinicznych.

Aktywność lokomotoryczna po jednorazowych i wielokrotnych podaniach

Agoniści receptora μ wywołują nasilenie aktywności lokomotorycznej i jej sensytyzację w trakcie wielokrotnych podań (Contarino i in., 2002; Hall i in., 2003). Receptor μ zaangażowany jest również w zmiany aktywności lokomotorycznej wywoływane przez inne substancje psychoaktywne (Charbogne i in., 2014).

Aktywność lokomotoryczną myszy wywołaną podaniami PZM21, SR-14968 oraz SR-17018 analizowano po jednorazowych i wielokrotnych podaniach. Otrzymane wyniki wykazały, że badane substancje w odmienny sposób wpływają na aktywność lokomotoryczną myszy. Jednorazowe podanie PZM21 nie zmieniło aktywności zwierząt w żadnej z badanych dawek. Po podaniach wielokrotnych także nie zaobserwowano istotnych zmian. Jedynie ponowne podanie najwyższej dawki (80 mg/kg) po okresie inkubacji wywołało nasilenie aktywności lokomotorycznej, chociaż wciąż niewielkie w porównaniu do działania morfiny. Działanie SR-17018 w dużym stopniu przypominało efekty PZM21 – po jednorazowym podaniu nie odnotowano istotnych zmian w aktywności myszy, w przebiegu wielokrotnych podań nie rozwinęła się sensytyzacja, natomiast podczas pomiaru aktywności po okresie inkubacji odnotowano jej nieznaczne (nieistotne statystycznie) nasilenie. Inny wzorzec aktywności lokomotorycznej zwierząt zaobserwowano w przypadku SR-14968. Jednorazowe podanie tego agonisty nasiliło aktywność lokomotoryczną myszy, a podczas wielokrotnych podań zaobserwowano tolerancję

tego efektu. Ponowne podanie agonisty doprowadziło jednak do wysokiej ekspresji aktywności po okresie inkubacji.

PZM21 oraz SR-17018 miały zatem znikomy wpływ na aktywność lokomotoryczną myszy, co koresponduje z brakiem reakcji Strauba u tych zwierząt. Natomiast SR-14968 powodował znaczny wzrost aktywności motorycznej u myszy po jednorazowym podaniu, jednak w przeciwieństwie do efektów typowych agonistów receptora μ , wraz z kolejnymi podaniami nie zaobserwowano sensytyzacji, lecz tolerancję. Może to być związane z tym, że zwierzęta były wyczerpane fizycznie i odwodnione po długotrwałej aktywności motorycznej po otrzymaniu pierwszej dawki agonisty. Analiza zmian masy ciała tych myszy w przebiegu doświadczenia wskazuje na stopniowy spadek i późniejszą stabilizację wagi, co może świadczyć o stopniowej adaptacji do działania związku.

Wywoływana przez opioidy aktywność motoryczna była rozważana w kontekście jej związku ze ścieżkami sygnałowymi i β -arr2. Badania na modelach transgenicznym sugerują osłabienie (Bohn i in., 2003) lub brak zmian (Kliwer i in., 2019) aktywności lokomotorycznej wywołanej przez morfinę u myszy z nokautem lub niemożnością wiązania β -arr2 do receptorów μ . W innych badaniach wykazano, że zaangażowanie ścieżki sygnałowej β -arr2-pERK jest kluczowe dla wywołanej morfiną hiperlokomocji, a mechanizm ten wymaga aktywacji receptorów dopaminowych D_1 (Urs i in., 2011). W tym kontekście brak nasilenia aktywności lokomotorycznej u myszy otrzymujących PZM21 lub SR-17018 wydaje się uzasadniony i możliwy do wyjaśnienia słabą aktywacją szlaku zależnego od β -arr2. Z kolei silnie stymulujące motorykę działanie SR-14968 po jednorazowym podaniu przypomina efekty konwencjonalnych agonistów receptora μ , pomimo że jest on agonistą selektywnym funkcjonalnie. Efekt ten może być zatem związany z innym, nieznanym w tym momencie mechanizmem.

Efekty nagradzające

Charakterystycznym efektem agonistów receptora μ jest wywoływanie u zwierząt preferencji miejsca (Tzschentke, 2007). Jak przedstawiono w niniejszej pracy, PZM21 oraz związki SR-14968 i SR-17018 odmiennie wpływały na zachowanie myszy w teście warunkowanej preferencji miejsca. Podania PZM21 w schemacie

dawka-odpowiedź, nie prowadziły do nabycia preferencji miejsca, a w najwyższej dawce (80 mg/kg) agonista miał działanie awersyjne. Przeciwnie, podania zarówno SR-14968, jak i SR-17018 (w efektywnych dawkach antynocyceptywnych), doprowadziły do wykształcenia się u zwierząt preferencji miejsca na poziomie porównywalnym do efektów morfiny. Na podstawie wyników można zatem założyć, że PZM21 nie działa nagradzającego, podczas gdy takie działanie mają obaj agoniści z grupy SR. Brak nagradzającego potencjału PZM21 jest spójny z wynikami opisanymi w publikacji, w której Manglik i in. (2016) wykazali brak warunkowanej preferencji miejsca u zwierząt otrzymujących PZM21 w dawce 20 mg/kg. W badaniach własnych udowodniono, że PZM21 nie działa nagradzająco w zakresie dawek, które mają efekt przeciwbólowy. Jest to interesująca obserwacja, ponieważ konwencjonalni agoniści receptora μ mają efekty nagradzające, a ich brak w przypadku PZM21 jest trudny do wyjaśnienia w oparciu o aktualny stan wiedzy. Warunkowana preferencja miejsca wywołana morfiną u myszy z nokautem β -arr2 była silniejsza niż w grupie kontrolnej (Bohn i in., 2003). Mogłoby to sugerować, że β -arr2 nie ma wpływu lub wręcz odgrywa rolę częściowo protekcyjną w regulowaniu behawioralnej odpowiedzi na nagrodę morfinową. Pojawia się zatem pytanie, czy brak nagradzającego działania PZM21 jest wynikiem wiarygodnym. Teoretycznie, brak wykształcenia przez zwierzęta preferencji miejsca mógłby wynikać z nieodpowiedniej długości sesji warunkowania. W teście odsuwania ogona działanie PZM21 rozwijało się wolno i stosunkowo późno osiągało wartość maksymalną. Mając to na uwadze, wydłużono sesje warunkowania do 60 minut, chociaż w wersji podstawowej praktykowanej w laboratorium trwają one 40 minut. Wynik fałszywie negatywny wydaje się więc mało prawdopodobny, tym bardziej że związki SR, których działanie także rozwijało się powoli, miały działanie nagradzające w tych samych warunkach eksperymentalnych. Co więcej, można wykluczyć potencjalne zaburzenia pamięci związane z podaniem myszom PZM21, które mogłyby przyczynić się do nienabycia preferencji, gdyż w testach badających funkcjonowanie poznawcze u myszy, którym podano PZM21 nie odnotowano zmian. Istnieje też prawdopodobieństwo, chociaż na ten moment słabo uzasadnione teoretycznie, że niektórzy stronniczy agoniści receptora μ mogą nie działać nagradzająco, przynajmniej w pewnym zakresie dawek. Koresponduje to z badaniami nad TRV130 (olicerydyną), w których nagradzające

efekty tego związku były zależne od dawki i w niskich, ale antynocyceptywnych dawkach, nie występowały (Liang i in., 2019; Manglik i in., 2016).

Alternatywnie, działanie PZM21 w tym teście można uzasadniać jego powinowactwem do receptora κ . W badaniach własnych wynosiło ono 22nM, co wskazuje na wysoki stopień wiązania z receptorem. Manglik i in. (2016) także zwracali uwagę na powinowactwo PZM21 wobec receptora κ (18 nM), jednak w badaniach *in vitro* wykazali, że oddziaływanie to ma charakter antagonistyczny. Uzyskane wyniki behawioralne mogłyby wskazywać raczej na agonistyczne działanie PZM21 na receptor κ , gdyż w najwyższej testowanej dawce wydaje się on mieć efekty awersyjne, typowe dla agonistów tego receptora (Darcq i Kieffer, 2018). PZM21 osłabiał ponadto nagradzające efekty morfiny (przedyskutowane zostało to w dalszej części pracy), co także raportowano w przypadku agonistów receptora κ (Bolanos i in., 1996; Funada i in., 1993).

Mikrodializa mózgu myszy, dzięki której zmierzony został zewnątrzkomórkowy poziom dopaminy i serotoniny w prążkowie po podaniu PZM21, miała na celu poszukiwanie możliwych mechanizmów odpowiedzialnych za brak nagradzającego działania tego związku. Nasilenie transmisji dopaminergicznej w prążkowie po podaniu opioidów było uprzednio wielokrotnie związane z ich uzależniającymi właściwościami (Barik i in., 2010; Di Chiara i Imperato, 1988; Spanagel i in., 1990). Uzyskane wyniki wskazały, że zewnątrzkomórkowy poziom dopaminy w prążkowie po podaniu PZM21 w dawce 40 mg/kg oraz morfiny w dawce 10 mg/kg wzrastał w podobnym stopniu. Te same dawki obu agonistów miały jednak odmienny wpływ na zachowanie zwierząt w teście warunkowanej preferencji miejsca, tj. myszy wykształciły silną preferencję wobec kontekstu skojarzonego z morfiną, podczas gdy PZM21 nie miał właściwości nagradzających. Wyniki tych badań mogą więc wskazywać, że nie ma bezpośredniej zależności między zewnątrzkomórkowym poziomem dopaminy w prążkowie a działaniem nagradzającym agonistów, mierzonym w paradygmacie warunkowanej preferencji miejsca. W ostatnich dekadach pojawiały się prace, których autorzy sugerowali, że dopamina nie jest niezbędna dla powstawania preferencji miejsca związanej z działaniem morfiny oraz dla samopodawania heroiny (Borgkvist i in., 2007; Hnasko i in., 2005; Pettit i in., 1984). Nagradzające działanie opioidów wydaje się więc jedynie częściowo zależeć od transmisji dopaminergicznej. Z drugiej strony, interesującą

obserwacją wynikającą z badań własnych jest obserwacja, że PZM21 wywoływał bardzo duży wzrost zewnątrzkomórkowego poziomu serotoniny w prążkowie myszy. Warto nadmienić, że Manglik i in. (2016) wykazali, że PZM21 jest słabym inhibitorem transporterów dopaminy i serotoniny. Stosunek poziomu serotoniny do dopaminy w mózgu był wiązany z jednej strony z przeciwbólową efektywnością opioidów (Major i Pleuvry, 1971), a z drugiej - z potencjałem uzależniającym. Wykazano między innymi, że neurony serotoninowe mają hamujący wpływ na komórki dopaminowe w układzie mezo limbicznym (Navailles i De Deurwaerdère, 2011; Rothman i in., 2008). Istnieje możliwość, że PZM21 nasila transmisję serotonergiczną i jednocześnie hamuje neurony dopaminergiczne i zachowania zależne od dopaminy, jak np. aktywność lokomotoryczną. Byłby to mechanizm niezwiązany z selektywnością funkcjonalną tego agonisty, jednak w tym momencie pozostaje jedynie spekulacją i jego weryfikacja wymagałaby dalszych, zaawansowanych badań.

W tej części badań zatem interesujące różnice między działaniem PZM21 a efektami SR-14968 i SR-17018. Wskazują one, że selektywność funkcjonalna agonistów receptora μ wobec białka G nie jest czynnikiem krytycznym dla działania nagradzającego. Być może w jakimś stopniu to inne właściwości farmakologiczne (np. niska aktywność wewnętrzna), mogą przyczyniać się do osłabienia nagradzającego potencjału agonistów receptora μ , jak ma to miejsce w przypadku PZM21.

Efekty wzmacniające i zachowania związane z poszukiwaniem substancji w okresie abstynencji

Kolejne badania prowadzono w kierunku dalszej oceny uzależniającego działania PZM21. Z uwagi na to, że wykazano brak działania nagradzającego tego agonisty w teście warunkowanej preferencji miejsca, w następnym doświadczeniu zastosowano procedurę dożylnego samopodawania tej substancji. Pozwala ona na ocenę wzmacniającego działania badanych związków oraz zachowań poszukiwawczych substancji w okresie abstynencji. PZM21, samopodawany dożylnie przez szczury w dawkach 0,05 i 0,5 mg/kg/infuzję, nie miał działania wzmacniającego, gdyż nie odnotowano istotnego wzrostu w liczbie infuzji oraz w liczbie naciśnięć dźwigni aktywnej. Ponadto, umieszczenie szczurów w klatce Skinnera w okresie wymuszonej abstynencji i prezentacja bodźców warunkowych nie miały istotnego wpływu na wystąpienie zachowania określanego jako poszukiwanie

substancji, tzn. zwiększonej liczby naciśnień dźwigni aktywnej w porównaniu do nieaktywnej. W momencie przeprowadzania i analizy tego doświadczenia było ono pierwszym mającym na celu ocenę wzmacniającego działania PZM21 i sugerowało, że w zakresie badanych dawek PZM21 nie ma takich właściwości. Następnie pojawiła się publikacja, której autorzy zbadali działanie PZM21 na rebusach (Ding i in., 2020). Wyniki otrzymane w tych badaniach wykazały, że PZM21 ma działanie wzmacniające u małp. Rozbieżność tych danych można uzasadniać zarówno różnicami gatunkowymi, jak i kwestiami metodologicznymi, ponieważ Ding i in. (2020) zastosowali inne kryteria wzmocnień niż te, które wykorzystano w badaniach własnych. Podobne zróżnicowanie wyników w modelu dożylnego samopodawania substancji miało miejsce w przypadku badania działania TRV130 (olicerydyny), co potwierdza wagę doboru odpowiednich dawek i kryteriów wzmocnień (Altarifi i in., 2017; Austin Zamarripa i in., 2018).

Chociaż w badaniach własnych nie przeprowadzono badań agonistów SR w modelu dożylnego samopodawania, w literaturze pojawiły się dane dotyczące efektów SR-14968 w teście rozróżniania leków (ang. *drug discrimination test*), który umożliwia obserwację zachowania zwierząt, które w specyficznych warunkach eksperymentalnych dokonują subiektywnej oceny działania substancji przez porównanie jej z efektami innych substancji psychoaktywnych (Young, 2009). We wspomnianym badaniu SR-14968 wykazywał działanie przypominające efekty fentanylu, jednak dokładniejsze analizy wykazały, że SR-14968 ma szerszy zakres okna terapeutycznego (antynocycepcja vs. potencjał uzależniający) niż inne ligandy receptora μ , tj. morfina, NAQ, nalbufina, buprenorfina i metadon (Schwienteck i in., 2019). Wyniki te sugerują więc, że selektywni funkcjonalnie agoniści receptora μ mogą działać uzależniająco, ale w pewnym zakresie efektywnych dawek uniknięcie tych efektów jest możliwe.

Podsumowując tę część badań należy podkreślić, że PZM21 nie działał wzmacniająco u szczurów, lecz przeciwne efekty zaobserwowano u rebusów. Najprawdopodobniej PZM21 ma pewien potencjał wzmacniający, chociaż działanie to jest dawkozależne i może zależeć od specyficznych kwestii metodologicznych. Przyszłe badania powinny więc określić, czy istnieje zakres dawek, w których PZM21 oraz inni selektywni funkcjonalnie agoniści receptora μ wywołują analgezję, lecz nie działają wzmacniająco.

Badania wchodzące w skład rozprawy zostały przeprowadzone przy wykorzystaniu modeli zwierzęcych, które mają ograniczony potencjał translacyjny. Pacjenci cierpiący na OUD zmagają się ze złożoną, przewlekłą i nawracającą chorobą ośrodkowego układu nerwowego, której pojedyncze symptomy można modelować, wykorzystując zwierzęta laboratoryjne. Wobec wyników badań należy jednak zachować krytycyzm, ponieważ wykorzystując modele zwierzęce, niezwykle ciężko jest odwzorować wszystkie aspekty i właściwą dynamikę zmian zachodzących w uzależnieniach lekowych (Kuhn i in., 2019; Spanagel, 2017).

3. Wpływ PZM21, SR-14968 i SR-17018 na behawioralne efekty morfiny

Jednym z celów niniejszej rozprawy było zbadanie wpływu PZM21, SR-14968 i SR-17018 na behawioralne efekty morfiny, modelowego agonisty receptora μ , często stosowanego w klinice. Badania te wpisują się w obszar farmakologii, którego zadaniem jest nie tylko opracowanie nowych, bezpiecznych i potencjalnie niezależniających agonistów receptorów opioidowych, ale też poszukiwanie skutecznej farmakoterapii OUD (Kuppalli i in., 2021). Jest to niezwykle istotne w kontekście epidemii opioidowej, która od ponad dwóch dekad przyczynia się do zatrważającej liczby zgonów związanych z uzależnieniem od opioidów i ich przedawkowaniem (Lyden i Binswanger, 2019; Skolnick, 2018; Upp i Waljee, 2020).

Na pierwszym etapie tej części badań oceniono wpływ łącznego podania PZM21, SR-14968 i SR-17018 na działanie antynocyceptywne morfiny u myszy. Selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ podano 30 minut przed morfiną, a efekty antynocyceptywne mierzono za pomocą testu odsuwania ogona. Wyniki badań wykazały, że podanie PZM21/agonistów SR nasila antynocyceptywne działanie morfiny. W przypadku PZM21 wykazano dodatkowo, że działanie to jest zależne od dawki. Badane substancje mogą być więc potencjalnie stosowane do uśmierzania bólu zarówno samodzielnie, jak i w połączeniu z innymi agonistami receptora μ . Eksperymenty te miały ograniczony zakres i zostały przeprowadzone w prostym schemacie doświadczalnym. Kolejne badania należałoby przeprowadzić z wykorzystaniem szerszego zakresu dawek i testów, dzięki czemu można by określić dokładny rodzaj interakcji farmakodynamicznej między badanymi agonistami a morfiną. Otrzymane wyniki są obiecujące, gdyż sugerują występowanie efektu

addycyjnego przy jednoczesnym braku zauważalnych działań toksycznych lub zmieniających zachowanie zwierząt.

Z klinicznego punktu widzenia, poważnym utrudnieniem farmakoterapii opioidowej jest rozwój tolerancji przeciwbólowej, stąd wciąż poszukuje się efektywnych strategii postępowania w tym zakresie (Martyn i in., 2019). W doświadczeniach zmierzono wpływ selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ na rozwój tolerancji na antynocyceptywne działanie morfiny. PZM21, SR-14968 lub SR-17018 podawano myszom 30 minut przed morfiną, raz dziennie przez tydzień, a rozwój tolerancji oceniano za pomocą testu odsuwania ogona. Nie zaobserwowano istotnego statystycznie wpływu PZM21 na rozwój tolerancji na efekty morfiny. Otrzymane wyniki wskazują natomiast na tendencję w kierunku hamowania rozwoju tolerancji morfinowej w grupach, którym podawano SR-14968 lub SR-17018. Wyniki opublikowane przez Grim i in. (2020) wykazały odwracanie tolerancji morfinowej przez SR-17018 w teście gorącej płytki. Z drugiej strony, podanie SR-17018 nie wpłynęło na tolerancję morfinową w teście zanurzania ogona u myszy (Pantouli i in., 2021). Wydaje się zatem, że wpływ SR-17018 i SR-14968 na rozwój tolerancji na działania morfiny jest niewielki i możliwy do uchwycenia jedynie w niektórych warunkach eksperymentalnych. Z pewnością warto dokładniej zbadać ten aspekt działania związków SR, ponieważ inny selektywny funkcjonalnie agonista receptora μ - TRV130 (olicerydyna) - hamował tolerancję na przeciwbólowe efekty fentanylu u myszy z neuropatią (Mori i in., 2017). Istnieje więc możliwość, że pewne aspekty działania funkcjonalnie selektywnych opioidów mogą być korzystne dla hamowania rozwoju tolerancji na analgezję opioidową.

Kolejne badania dotyczyły wpływu PZM21, SR-14968 i SR-17018 na zespół odstawienia u myszy uzależnionych od morfiny. Funkcjonalnie selektywnych agonistów receptora μ podano zwierzętom jednorazowo, 30 minut przed precypitacją odstawienia za pomocą podania naloksonu. Uzyskane wyniki wykazały, że PZM21, w sposób zależny od dawki, obniżał łączny efekt odstawienia, lecz jednocześnie jego podanie skutkowało nieznacznym zwiększeniem liczby skoków. Taki wynik utrudnia interpretację otrzymanych danych. Skoki zwyczajowo uznawane są za najbardziej typowy i najłatwiej policzalny objaw odstawienia u myszy. Z kolei na współczynnik odstawienia składa się cały zespół zachowań, obejmujący, obok skoków, zgrzytanie zębami, potrząsanie całym ciałem (ang. *wet dogs*), wspięcia na tylne łapy, drżenie łap

oraz intensywność defekacji. Niższa wartość łącznego efektu odstawienia w grupach myszy, które otrzymały PZM21, wynika z braku występowania w tych grupach większości wysoko punktowanych objawów. Można tym samym stwierdzić, że PZM21, choć nieznacznie nasila odstawienie od morfiny mierzone liczbą skoków, osłabia jednocześnie inne objawy odstawienia, a szczególnie defekacje. Zaobserwowane różnice wynikają być może z różnego wpływu PZM21 na obwodowe i ośrodkowe objawy odstawienia od morfiny. Biegunka występująca w następstwie odstawienia od opioidów jest mediowana przez receptory opioidowe zlokalizowane w przewodzie pokarmowym, natomiast skoki wywołane odstawieniem wydają się mieć pochodzenie ośrodkowe (Bianchetti i in., 1986; Koob i in., 1992; Maldonado i in., 1992). Możliwe zatem, że PZM21 może wywierać odmienne efekty w zależności od lokalizacji/podtypu receptorów μ , na które działa. Niemniej, wyniki badań sugerują, że PZM21 może skutecznie hamować niektóre obwodowe objawy odstawienia od opioidów.

Analogiczne doświadczenie przeprowadzono także, aby ocenić wpływ SR-14968 i SR-17018 na nasilenie zespołu odstawienia od morfiny. W tym przypadku badane związki wpływały hamująco na objawy odstawienia mierzone za pomocą łącznego efektu odstawienia (tendencja) oraz liczby skoków (istotny statystycznie spadek w grupie SR-17018 i nieznaczne obniżenie w grupie SR-14968). Grim i in. (2020) wykazali, że podanie SR-17018 osłabia objawy spontanicznego odstawienia od morfiny w okresie abstynencji. Wyniki badań własnych są więc spójne z dostępnymi w literaturze i wskazują, że SR-17018 może być potencjalnie skutecznym środkiem farmakologicznym osłabiającym zespół odstawienia od morfiny (lub innych opioidów), mogącym znaleźć zastosowanie w terapii OUD (Uchtenhagen, 2003). Stahl i in. (2021) zaproponowali interesującą interpretację, która sugeruje mechanizm hamującego wpływu SR-17018 na zespół odstawienia od morfiny oraz przywracania przez tego agonistę efektywności morfiny u myszy, które były od niej uzależnione. Miałoby to wynikać z tego, że SR-17018 (a także SR-14968) są niekompetywnymi agonistami receptora μ i ta właściwość pozwala na stabilizację aktywnego stanu receptora oraz odbudowę wrażliwości na ortosterycznego agonistę (morfinę) przy jednoczesnym podtrzymywaniu aktywacji receptora (zapobieganie odstawieniu). Zgodnie z tym wyjaśnieniem, przewaga agonistów SR nad

konwencjonalnymi agonistami receptora μ wynikałaby raczej ze sposobu, w jaki aktywują szlak zależny od białka G, niż z faktu, że słabo oddziałują z β -arr2.

Z uwagi na to, że PZM21 działał nagradzająco, oceniono także jego wpływ na nabywanie przez myszy warunkowanej preferencji miejsca wywołanej morfiną. Uzyskane wyniki wykazały PZM21, podawany 30 minut przed morfiną, osłabiał jej nagradzające efekty w tym teście. Mechanizm tego działania nie jest jednoznaczny. Możliwe, że PZM21, z uwagi na jego wysokie powinowactwo do receptora μ , osłabiał wiązanie morfiny do receptora μ , uniemożliwiając wykształcenie preferencji miejsca. Innym wyjaśnieniem tego efektu może być niska aktywność wewnętrzna PZM21. Badania wskazują, że częściowi agoniści receptora μ (np. buprenorfina) mogą osłabiać nagradzające właściwości opioidów i psychostymulantów (Cordery i in., 2014; Kosten i in., 1991). Należy jednak mieć na uwadze, że działanie buprenorfiny w tym teście może zależeć od aktywacji/blokady innych receptorów opioidowych. Możliwym mechanizmem odpowiedzialnym za ten efekt PZM21 może być także jego oddziaływanie z receptorem κ . Wielokrotnie wykazywano, że agoniści tego receptora osłabiają nagradzające lub wzmacniające właściwości opioidów (Abdel-Ghany i in., 2015; Kuzmin i in., 1997; Tao i in., 2006; Tsuji i in., 2001).

Reasumując, rezultaty tej części rozprawy wskazują, że PZM21, SR-14968 i SR-17018 modulują behawioralne efekty morfiny. Badani agoniści nasilają wywołaną morfiną antynocycępcję. Istnieje możliwość, że SR-17018 (i w mniejszym stopniu także SR-14968) mogą osłabiać rozwój tolerancji na działanie morfiny, jednak w tym obszarze wyniki nie są jednoznaczne i wymagają jeszcze weryfikacji. Z kolei wszystkie badane związki wydają się osłabiać wybrane symptomy odstawienia od morfiny, a PZM21 dodatkowo blokuje jej nagradzające właściwości. Dalsze badanie tych agonistów pod kątem ich wykorzystania w farmakoterapii OUD wydaje się zatem zasadne.

4. Wpływ PZM21 na efekty stresu

Z uwagi na to, że PZM21 nie miał działania nagradzającego i wzmacniającego w badaniach własnych, zdecydowano się dodatkowo ocenić jego efekty w zwierzęcych modelach odpowiedzi na stres. Testy wymuszonego pływania i zawieszenia za ogon są używane do badania przeciwdepresyjnego działania

substancji chemicznych (Can, Dao, Arad i in., 2012; Can, Dao, Terrillion i in., 2012), ale jednocześnie umożliwiają obserwację reakcji zwierząt w sytuacji niemożliwego do uniknięcia stresu. Zwierzę może zareagować aktywną strategią radzenia sobie (pływanie, wspinanie się) lub bezradnością (bezruchem; Commons i in., 2017). Podanie morfiny (30 minut przed testem) zmniejszyło ilość czasu spędzonego w bezruchu podczas wymuszonego pływania oraz zawieszenia za ogon, interpretowanego jako bezradność w sytuacji ostrego stresu. Jest to zgodne z wynikami innych autorów, którzy obserwowali taki sam kierunek zmian w tych testach po podaniu morfiny, także u myszy Albino Swiss (Berrocoso i in., 2013; Eschalier i in., 1987; Zomkowski i in., 2005). Stymulacja receptorów μ przez endomorfiny-1 i endomorfiny-2, podane dokomorowo, także skutkowała obniżeniem czasu bezruchu w testach zawieszenia za ogon i wymuszonego pływania (Fichna i in., 2007). Protekcyjne działanie endogenego układu opioidowego oraz morfiny wykazano ponadto w innych modelach wyuczonej bezradności (Besson i in., 1996, 1998; Tejedor-Real i in., 1995). W badaniach własnych udało się zatem uzyskać podobne wyniki. Świadczą one o pozytywnym udziale receptora μ w osłabianiu wyuczonej bezradności w odpowiedzi na ostry, jednorazowy stres. Zgodnie z danymi innych autorów działanie morfiny nie wynika z jej wpływu na aktywność lokomotoryczną myszy oraz jest antagonizowane przez nalokson, co świadczy o tym, że jest to mechanizm zależny od układu opioidowego (Zomkowski i in., 2005). Wielokrotnie sugerowano, że efekty te mają związek z wysoką ekspresją receptorów μ w strukturach układu limbicznego odpowiedzialnych za przetwarzanie bodźców o charakterze emocjonalnym oraz w obszarach zawierających wysoki poziom monoamin (Fichna i in., 2007; Lutz i in., 2021; Puryear i in., 2020). Dodatkowo, mając na uwadze, że podanie PZM21 mocno wpływa na nasilenie transmisji serotoninergetycznej (co wykazano w eksperymencie mikrodializy mózgu), można było oczekiwać, że podanie tego agonisty wywoła efekty podobne do morfiny. Wyniki zaprezentowane w rozprawie nie wykazały jednak istotnego wpływu PZM21 na odpowiedź behawioralną myszy w tych testach. W teście wymuszonego pływania zaobserwowano nawet, że podanie PZM21 w dawce 20 mg/kg zwiększa czas bezruchu badanych zwierząt. Efekt ten nie potwierdził się jednak w teście zawieszenia za ogon. Wytłumaczenie rozbieżności między efektami morfiny i PZM21

jest na tym etapie trudne i wymaga dodatkowych badań. Prawdopodobne wydaje się, że morfina i PZM21 mogą działać na inne typy/populacje receptorów μ .

Wyniki uzyskane w teście jasnego/ciemnego pudełka wykazały, że zarówno PZM21, jak i morfina, podane jednorazowo, 30 minut przed testem behawioralnym, nasilają lękowość zwierząt. Funkcjonalne znaczenie receptorów μ w zachowaniach związanych z lękiem pozostaje kontrowersyjne. W zależności od badanych parametrów, miejsca podania agonisty oraz modelu wykorzystanego w badaniach opisywano udział tych receptorów w mechanizmach hamujących oraz nasilających poziom lęku (Becker i in., 2014; Filliol i in., 2000; Le Merrer i in., 2006; Shin i in., 2003; Wilson i Junor, 2008). Rezultaty zaprezentowane w rozprawie wskazują, że morfina i PZM21 w badanych dawkach nasilają lękowość u myszy Albino Swiss. Jednocześnie brak międzygrupowych różnic w liczbie przejść między obiema częściami aparatu wskazuje, że na otrzymane wyniki nie wpłynęły zmiany w aktywności myszy. Podsumowując, w badaniach własnych nie wykazano wpływu PZM21 na odpowiedź behawioralną myszy na ostry, jednorazowy stres. Otrzymane wyniki sugerują, że PZM21 może mieć w pewnych warunkach działanie anksjogenne, jednak ten aspekt należy jeszcze dokładniej zbadać.

W tej części doświadczeń przeprowadzono także test warunkowania strachem, który miał na celu odwzorować typowe dla PTSD zaburzenia, jakimi są uporczywe wspomnienia traumy, szczególnie podczas ekspozycji na skojarzony z nią kontekst (Brewin, 2011; Kida, 2019). Z uwagi na dostępność danych świadczących o protekcyjnym działaniu morfiny w tym modelu (Szklarczyk i in., 2015, 2016; Zelek-Molik i in., 2019), interesujące wydało się zbadanie efektów podania PZM21 w takich samych warunkach. Rezultaty doświadczenia nie wykazały jednak istotnego wpływu morfiny ani PZM21 na reakcję zastygania podczas ekspozycji myszy na kontekst, w którym uprzednio doświadczyły traumy. Jedynie podczas ostatniego wystawienia zwierząt na traumatyczny kontekst można zauważyć tendencję w kierunku osłabienia reakcji zastygania u myszy, którym podano najwyższe badane dawki agonistów. Ta część badań wskazuje, że efekty morfiny w modelu warunkowania strachem u myszy mogą być trudne do uchwycenia. Być może dlatego, że są one subtelne lub łatwiejsze do wykazania w innych testach behawioralnych. Skuteczność morfiny w blokowaniu konsolidacji traumatycznych wspomnień udowodniono u osób z doświadczeniem traumy (Bryant i in., 2009; Holbrook i in., 2010; Saxe i in.,

2001), stąd wydaje się, że brak istotnych zmian w tym doświadczeniu związany jest raczej z niedoskonałością modelu niż z brakiem efektów farmakologicznych morfiny. Choć przeprowadzone badania nie prowadzą do jasnych wniosków dotyczących działania PZM21, to jednak najprawdopodobniej agonista ten nie zmienia w znaczącym stopniu reakcji uwarunkowanego strachu.

Podsumowując, w badaniach własnych nie odnotowano istotnego wpływu PZM21 na odpowiedź zwierząt na stres wymuszonego pływania i zawieszenia za ogon oraz pamięć związaną z traumą. Z drugiej strony wstępne wyniki dotyczące wpływu tego związku na lękowość zwierząt sugerują, że może on mieć działanie anksjogenne. Badania w tym zakresie z pewnością należy rozszerzyć, aby móc w pełni odpowiedzieć na pytanie o występowanie oraz charakter ewentualnych zmian. Na aktualnym etapie badań wydaje się jednak, że PZM21 nie działa protekcyjne w zaburzeniach związanych ze stresem.

Znaczenie wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych w modulacji odpowiedzi na stres nie było dotychczas szeroko badane. Dostępne dane dotyczą jedynie agonistów receptora opioidowego δ i sugerują, że zależna od β -arr2 sygnalizacja ERK ma związek z osłabianiem lękowości i uwarunkowanego strachu, a preferencyjna aktywacja szlaku białka G może nasilać reakcję strachu (Ko i in., 2021). Bez dalszych dokładnych badań trudno przewidywać, czy w przypadku agonistów receptora μ rola wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych jest taka sama jak w przypadku agonistów receptora δ . Istnieje możliwość, że sygnalizacja zależna od β -arr2 odgrywa ważną rolę w regulacji reakcji emocjonalnych i z tego powodu agoniści selektywni funkcjonalnie wobec białka G nie będą w tych warunkach skuteczni.

5. Analiza działania funkcjonalnie selektywnych agonistów receptora μ w kontekście nowych danych dotyczących roli β -arestyny-2 w niepożądanych działaniach opioidów

Badania nad selektywnymi funkcjonalnie agonistami receptorów opioidowych zyskały w ostatnich latach znaczącą popularność, co odzwierciedla się w dużej liczbie publikacji dotyczących zarówno charakterystyki nowych agonistów, jak i projektów ukierunkowanych na ocenę funkcjonalnego znaczenia wewnątrzkomórkowych

ścieżek sygnałowych dla terapeutycznych oraz niepożądanych efektów substancji opioidowych.

Chociaż wpływ PZM21, SR-14968 i SR-17018 na depresję oddechową nie był przedmiotem niniejszej rozprawy, warto pokrótce wspomnieć o danych na ten temat, ponieważ mają one kluczowe znaczenie dla ogólnej oceny bezpieczeństwa i skuteczności tych agonistów. Zgodnie z wynikami opublikowanymi przez Hilla i in. (2018), podanie myszom PZM21 (w całym zakresie testowanych dawek, do 80 mg/kg) prowadziło do depresji ośrodka oddechowego. Efekt nie był zależny od szczepu myszy wykorzystanych do badań i nie ulegał tolerancji. Hamowanie ośrodka oddechowego po podaniu PZM21 opisano także w innej pracy (Gillis i in., 2020a). Wyniki tych badań są uderzająco sprzeczne z oryginalnymi danymi przedstawionymi w pracy opisującej odkrycie PZM21 (Manglik i in., 2016). W badaniach własnych także zaobserwowano przejściowy okres gorszego samopoczucia myszy, pojawiający się po ok. 10-15 minutach po podaniu i ustępujący po upływie kolejnego kwadransa. Charakteryzował się on ogólnym zahamowaniem motorycznym zwierząt i niechęcią do interakcji. Parametry związane z oddychaniem nie były mierzone z uwagi na brak specjalistycznego sprzętu, ale z wysokim prawdopodobieństwem można założyć, że był to właśnie okres nasilonej depresji oddechowej związanej z działaniem agonisty. Jest to tym bardziej możliwe, że okno czasowe występowania objawów koresponduje z okresem najsilniejszej depresji oddechowej opisanej przez Hilla i in. (2018).

Brak wpływu SR-14968 i SR-17018 na ośrodek oddechowy wykazano w oryginalnej pracy opisującej odkrycie tych związków (Schmid i in., 2017). Z kolei Gillis i in. (2020a) przedstawili wyniki, zgodnie z którymi SR-17018 wywołuje depresję oddechową w najwyższej testowanej dawce (30 mg/kg), lecz w porównaniu do innych badanych opioidów efekt ten wciąż był niewielki. Wyniki tych badań nie zostały jeszcze zreplikowane ani też jednoznacznie zakwestionowane.

Pierwsze badania na myszach z nokautem β -arr2 wskazywały, że wykluczenie szlaku sygnałowego zależnego od tego białka pozwala uniknąć depresji oddechowej wynikającej z podania morfiny (Raehal i in., 2005). Doświadczenia, które przeprowadzono w ostatnim czasie, nie potwierdziły jednak tych obserwacji, podając w wątpliwość, że selektywność funkcjonalna ma kluczowe znaczenie dla braku depresji oddechowej wywoływanej przez opioidy. Badania na myszach wyrażających

zmodyfikowany receptor μ , co zapobiegało fosforylacji receptora i wiązaniu β -arr2 wykazały, że taka manipulacja nie ma wpływu na depresję oddechową występującą po podaniu morfiny i fentanylu (Kliwer i in., 2019). Z kolei w pracy Kliwer i in. (2020) opisano próbę replikacji oryginalnych badań na zwierzętach transgenicznych z nokautem β -arr2. Wyników Raehal i in. (2005) nie udało się powtórzyć trzem niezależnym ośrodkom badawczym, ponieważ morfina i fentanyl wywoływały depresję ośrodka oddechowego u myszy pozbawionych β -arr2. W tych samych badaniach zaobserwowano, że mutacja nie wpłynęła także na osłabienie zaparc. Rozbieżności między badaniami na teoretycznie tych samych myszach z nokautem β -arr2 tłumaczono kwestiami metodologicznymi związanymi z utrzymywaniem linii zwierząt transgenicznych i tłem genetycznym myszy wykorzystanych do krzyżowań. Brak wpływu nokautu β -arr2 na depresję oddechową wywołaną morfiną potwierdził też inny zespół badawczy (Bachmutsky i in., 2021).

W kontekście przytoczonych powyżej danych wydaje się, że idea selektywności funkcjonalnej agonistów receptora μ powinna zostać poddana ponownej ocenie. Badania sugerują, że wykluczenie ścieżki sygnałowej związanej z β -arr2 może, przynajmniej w pewnym stopniu, przyczynić się do silniejszego działania agonistów receptora μ oraz wolniejszego rozwoju tolerancji (Bohn i in., 2000; Kliwer i in., 2019; Przewłocka i in., 2002; Yang i in., 2011). Pomimo to, ligandy selektywnie działające przez ścieżkę sygnałową związaną z białkiem G różnie wpływają na tolerancję. Wydaje się więc, że wpływ poszczególnych agonistów na rozwój tolerancji jest charakterystyczną cechą danego związku i może angażować zarówno sygnalizację zależną od β -arr2, jak i z nią niezwiązaną. Co więcej, znaczenie β -arr2 w rozwoju zależności fizycznej oraz powstawaniu nagradzających i lokomotorycznych efektów agonistów receptora μ także zostało, przynajmniej częściowo, zakwestionowane przez Kliwer i in. (2019).

Podsumowując, przytoczone powyżej przykłady pokazują, że wyniki badań na transgenicznych modelach zwierzęcych nie zawsze przekładają się na działanie nowych substancji chemicznych, które opracowano w oparciu o ideę selektywności funkcjonalnej. Obecnie wydaje się, że wykluczenie ścieżki sygnałowej związanej z β -arr2 nie jest wystarczające dla powstania opioidów pozbawionych działań niepożądanych.

6. Wpływ idei selektywności funkcjonalnej na opracowywanie nowych leków opioidowych

W świetle wyników badań własnych oraz doniesień innych autorów, można zadać pytanie, czy selektywność funkcjonalna jest zasadnym podejściem do poszukiwania skutecznych, bezpiecznych i niezależniających leków opioidowych.

Wyniki badań, na których oparto ideę selektywności funkcjonalnej, budzą aktualnie pewne wątpliwości, ponieważ β -arr2 nie wydaje się zaangażowana we wszystkie działania niepożądane agonistów receptora μ . Sztynny podział wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych na zaangażowane w pożądane efekty terapeutyczne oraz odpowiedzialne za działania niepożądane jest nadmiernym uproszczeniem, ponieważ nie uwzględnia całej złożoności biologii receptorów GPCR i kaskad przekazywania sygnału. Z drugiej strony, dzięki idei selektywności funkcjonalnej nastąpiła zmiana klasycznego rozumienia mechanizmów oddziaływania cząsteczek z receptorem, które opierało się na prostym rozróżnieniu stanów aktywacji i hamowania ścieżek sygnałowych w zależności od związania agonisty lub antagonisty. Obecnie uważa się, że wiązanie liganda z receptorem GPCR może niezależnie prowadzić do aktywacji lub hamowania wielu układów efektorowych. Układy te z kolei związane są z różnymi fazami sygnalizacji zależnymi od białka G, β -arr2 czy GRK. Mając to na uwadze, Smith i in. (2018) nazwali receptory GPCR „allosterycznymi mikroprocesorami”, co oddaje złożoność ich oddziaływania z różnymi ligandami. Wynika to z tego, że cząsteczki wiążą się do różnych miejsc w receptorze, stabilizując jego odmienne konformacje, które z kolei wpływają na specyfikę sygnalizacji przez rekrutację różnych białek, co w efekcie wpływa na specyficzne efekty danego liganda (Kenakin, 2015). Należy też pamiętać, że cechy „stronniczości” może przejawiać zarówno ligand, jak i receptor oraz cały system (Smith i in., 2018). Jak podkreślają autorzy cytowanej pracy, receptory GPCR mogą mieć różne właściwości sygnalizacyjne zależnie od tkanki lub układu, w którym są wyrażane, a ci sami agoniści mogą tym samym wywoływać różne efekty w różnych regionach mózgu. Selektywność funkcjonalna względem określonej ścieżki może być więc zjawiskiem pożądanym dla pewnych efektów i jednocześnie niekorzystnym dla innych. Co interesujące, międzygatunkowe różnice (np. w ekspresji białek i kinaz zaangażowanych w przekazywanie sygnału przez GPCR) mogą też przyczyniać się do

tego, że niektóre ligandy przejawiają znaczącą selektywność funkcjonalną tylko u pewnych gatunków (Schattauer i in., 2017). Ma to duże znaczenie w rozważaniach nad translacyjnym znaczeniem badań podstawowych. Pomimo że idea stronniczego agonizmu nie doprowadziła dotąd do odkrycia całkowicie bezpiecznych i niezależniających opioidów, z pewnością istotnie przyczyniła się do wzbogacenia wiedzy o mechanizmach przekazywania sygnału przez GPCR oraz o funkcjonalnym znaczeniu określonych ścieżek sygnałowych.

Kolejną grupą zagadnień, które stanowią poważny problem, jest kwestia wyznaczania współczynnika selektywności funkcjonalnej (ang. *bias factor*), który może różnić się w zależności od testów *in vitro*, ligandów referencyjnych oraz metod obliczeniowych wykorzystanych do jego określenia (Kenakin, 2019). W kilku przypadkach status agonistów opisanych początkowo jako selektywne funkcjonalnie został podany w wątpliwość (Gillis i in., 2020a; Hill i in., 2018). Testy komórkowe, w których mierzy się aktywność białka G, mogą być często niewrażliwe na wahania aktywności wewnętrznej agonistów, co w jakimś stopniu może tłumaczyć wstępną klasyfikację pewnych związków jako wysoce skutecznych w aktywacji białek G (Gillis i in., 2020b). Powstało na ten temat kilka interesujących prac przeglądowych, które precyzyjnie tłumaczą ten problem (Gillis i in., 2020b; Kelly, 2013; Kenakin, 2019; Onaran i in., 2017).

Charakteryzując agonistów będących przedmiotem tej pracy, należy mieć na uwadze także ocenę ich oddziaływania z receptorami opioidowymi i związane z tym efekty farmakologiczne. Ma to duże znaczenie m.in. w interpretacji niektórych efektów PZM21. Zarówno wyniki doświadczeń behawioralnych (tj. efekt pułapowy w działaniu antynocyceptywnym, szybki rozwój tolerancji), jak też dane własne i inne opublikowane wyniki eksperymentów *in vitro* (Gillis i in., 2020a; Hill i in., 2018; Yudin i Rohacs, 2019) wskazują na to, że PZM21 jest częściowym agonistą receptora μ . Agoniści tego typu cechują się niższym ryzykiem wywołania potencjalnie śmiertelnej depresji ośrodka oddechowego (Kelly, 2013). Częściowy agonizm PZM21 może w pewnym stopniu tłumaczyć jego niższy potencjał uzależniający, chociaż jednocześnie nie zapobiega występowaniu depresji oddechowej po podaniu tego związku. Selektywność funkcjonalna PZM21 i jego częściowy agonizm najprawdopodobniej niezależnie przyczyniają się do jego efektywności, bezpieczeństwa i profilu działań niepożądanych.

Dyskusja

W ostatnich latach to właśnie selektywność funkcjonalna była w centrum uwagi jako podejście do opracowania nowych, bezpiecznych opioidów. W rozprawie omówiono działanie stronniczych agonistów receptora opioidowego μ , ale warto podkreślić, że interesującą grupą związków są też selektywni funkcjonalnie agoniści receptora κ (Mores i in., 2019) oraz – nieco mniej popularni – stronniczy agoniści receptora δ , a nawet ORL-1 (Faouzi i in., 2020). Istnieją ponadto inne podejścia, niezwiązane bezpośrednio z selektywnością funkcjonalną, których celem także jest opracowanie bezpiecznych i niezależniających opioidów. Zgodnie z jedną z koncepcji, możliwym sposobem na uniknięcie działań niepożądanych opioidów jest opracowywanie ligandów zależnych od pH, działających jedynie w tkankach zmienionych chorobowo, niemających wpływu na funkcje ośrodkowe (Spahn i in., 2017, 2018). Osobną, bardzo obszerną grupę, stanowią związki chemiczne wywierające efekty biologiczne za pośrednictwem więcej niż jednego receptora (związki hybrydowe, heterodimery), które mogą m.in. cechować się opóźnionym rozwojem tolerancji (Gomes i in., 2013; Piotrowska i in., 2021; Zhang i in., 2020).

Podsumowując, chociaż wysiłki włożone w próby opracowania skutecznych, a jednocześnie bezpiecznych i niezależniających opioidów nie zakończyły się pełnym sukcesem, doprowadziły do odkrycia przynajmniej kilku selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ o bardzo interesującym działaniu. TRV130 (olicerydyna) jest stosowany w Stanach Zjednoczonych w farmakoterapii bólu, a kolejne związki, badane w ramach niniejszej rozprawy, charakteryzują się osłabionym wpływem na niektóre symptomy uzależnienia, a także, w przypadku SR-14968 i SR-17018, niższym ryzykiem wywołania depresji oddechowej. Ostatnie badania w tym zakresie z pewnością przyczyniły się także do zmian w zakresie „starej doktryny”, zgodnie z którą najlepszymi analgetykami są agoniści receptora μ o wysokim powinowactwie i wysokim stopniu aktywności wewnętrznej (Azzam i in., 2019). Przyszłe badania będą prawdopodobnie ukierunkowane na poszukiwanie ligandów o złożonej farmakologii, działających za pośrednictwem wybranych ścieżek sygnałowych, w specyficznych tkankach lub populacjach komórkowych, mających powinowactwo do różnych receptorów. Idea selektywności funkcjonalnej w opracowywaniu lepszych leków opioidowych odgrywa znaczącą rolę, lecz prawdopodobnie nie jest ona kluczowa.

Podsumowanie i wnioski

Celem pracy była charakterystyka działania nowych eksperymentalnych agonistów receptora opioidowego μ cechujących się selektywnością funkcjonalną wobec białka G. Otrzymane wyniki skłaniają do postawienia poniższych wniosków:

1. Badane związki wywoływały zależną od dawki i długotrwałą antynocycepcję. W odróżnieniu od podań agonistów SR-14968 i SR-17018, PZM21 nie wywoływał maksymalnej odpowiedzi antynocyceptywnej.

Funkcjonalnie selektywni agoniści receptora μ działają przeciwbólowo, jednakże ich efektywność zależy od charakterystycznych cech interakcji danego agonisty z receptorem.

2. PZM21 nie miał działania nagradzającego i wzmacniającego, a w dawkach wystarczających do osiągnięcia skutecznej antynocycepcji nie wywoływał także silnej zależności fizycznej. SR-14968 i SR-17018 charakteryzowały się natomiast wysokim potencjałem do wywoływania zależności fizycznej i efektów nagradzających. Wielokrotne podania PZM21 skutkowały szybkim rozwojem tolerancji, która w przypadku obu agonistów z grupy SR była nieznacznie opóźniona w stosunku do rozwoju tolerancji morfinowej.

Selektywni funkcjonalnie agoniści receptora μ różnie wpływają na zachowania związane z uzależnieniem. Rezultaty przeprowadzonych badań wskazują, że selektywność funkcjonalna nie wydaje się istotnym czynnikiem determinującym uzależniający potencjał agonistów receptora μ .

3. PZM21, SR-14968 oraz SR-17018 nasilały antynocyceptywne działanie morfiny, a agoniści SR dodatkowo nieznacznie spowalniaли rozwój tolerancji na ten efekt w trakcie wielokrotnych podań. Wszystkie badane związki osłabiały ponadto wybrane symptomy odstawienia od morfiny, a PZM21 przyczyniał się do osłabiania jej nagradzających właściwości.

Selektywni funkcjonalnie agoniści receptora μ istotnie wpływają na uzależniające działanie morfiny, co wskazuje na ich potencjalne zastosowanie w farmakoterapii OUD.

4. PZM21 nie miał istotnego wpływu na natychmiastową odpowiedź na stres oraz pamięć związaną ze strachem.

Badania nad efektami selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ w modelach stresu powinny być kontynuowane, jednak wstępne dane nie wskazują na ich terapeutyczne działanie w zaburzeniach związanych ze stresem.

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie przyczyniły się przede wszystkim do głębszego poznania roli wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych aktywowanych przez agonistów receptora μ w powstawaniu różnych objawów związanych z uzależnieniem. Rezultaty badań wskazały na zróżnicowane, ale obiecujące właściwości badanych związków. Wszystkie substancje wykazują działanie przeciwbólowe i hamują wybrane aspekty uzależnienia od morfiny. Ponadto, PZM21 nie działa nagradzająco, co jest interesującą obserwacją i wymaga kolejnych badań w celu określenia mechanizmu, który za to odpowiada. Wyniki badań sugerują, że selektywna aktywacja wybranych ścieżek sygnałowych zależnych od receptora μ nie prowadzi do jednokierunkowych efektów farmakologicznych. Wydaje się, że selektywni funkcjonalnie agoniści receptora μ to heterogenna grupa związków chemicznych o zróżnicowanym wpływie na pożądane i niepożądane efekty. Użyteczność terapeutyczna tych związków powinna być oceniana indywidualnie w porównaniu do działania konwencjonalnych agonistów receptora μ .

Literatura

- Abdel-Ghany, R., Nabil, M., Abdel-Aal, M. i Barakat, W. (2015). Nalbuphine could decrease the rewarding effect induced by tramadol in mice while enhancing its antinociceptive activity. *European Journal of Pharmacology*, 758, 11–15.
- Abdel-Zaher, A. O., Hamdy, M. M., Aly, S. A., Abdel-Hady, R. H. i Abdel-Rahman, S. (2006). Attenuation of morphine tolerance and dependence by aminoguanidine in mice. *European Journal of Pharmacology*, 540(1), 60–66.
- Alenezi, A., Yahyouche, A. i Paudyal, V. (2021). Current status of opioid epidemic in the United Kingdom and strategies for treatment optimisation in chronic pain. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 43(2), 318-322.
- Al-Hasani, R. i Bruchas, M. R. (2011). Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*, 115(6), 1363–1381.
- Allouche, S., Noble, F. i Marie, N. (2014). Opioid receptor desensitization: Mechanisms and its link to tolerance. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 280.
- Al-Qattan, M. N., Das, N. i Tripathi, R. K. P. (2020). Pharmacology of Endogenous Opioids, Opiates and Their Receptors. W: P. Kumar i P. K. Deb (red.), *Frontiers in Pharmacology of Neurotransmitters* (s. 381–414). Springer.
- Altarifi, A. A., David, B., Muchhala, K. H., Blough, B. E., Akbarali, H. i Negus, S. S. (2017). Effects of acute and repeated treatment with the biased mu opioid receptor agonist TRV130 (olicepidine) on measures of antinociception, gastrointestinal function, and abuse liability in rodents. *Journal of Psychopharmacology* 31(6), 730–739.
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (Fifth Edition). American Psychiatric Association.
- Arico, C. i McNally, G. P. (2014). Opioid receptors regulate blocking and overexpectation of fear learning in conditioned suppression. *Behavioral Neuroscience*, 128(2), 199–206.
- Austin Zamarripa, C., Edwards, S. R., Qureshi, H. N., Yi, J. N., Blough, B. E. i Freeman, K. B. (2018). The G-protein biased mu-opioid agonist, TRV130, produces reinforcing and antinociceptive effects that are comparable to oxycodone in rats. *Drug and Alcohol Dependence*, 192, 158–162.
- Azzam, A. A., McDonald, J. i Lambert, D. G. (2019). Hot topics in opioid pharmacology: mixed and biased opioids. *British Journal of Anaesthesia*, 122(6), e136-e145.
- Bachmutsky, I., Wei, X. P., Durand, A. i Yackle, K. (2021). SS-arrestin 2 germline knockout does not attenuate opioid respiratory depression. *ELife*, 10, e62552.
- Bachmutsky, I., Wei, X. P., Kish, E. i Yackle, K. (2020). Opioids depress breathing through two small brainstem sites. *ELife*, 9, e52694.
- Bali, A., Randhawa, P. K. i Jaggi, A. S. (2015). Stress and opioids: Role of opioids in modulating stress-related behavior and effect of stress on morphine conditioned place preference. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 51, 138–150.
- Barik, J., Parnaudeau, S., Saint Amax, A. L., Guiard, B. P., Golib Dzib, J. F., Bocquet, O., Bailly, A., Benecke, A. i Tronche, F. (2010). Glucocorticoid receptors in

- dopaminoceptive neurons, key for cocaine, are dispensable for molecular and behavioral morphine responses. *Biological Psychiatry*, 68(3), 231–239.
- Becker, J. A. J., Clesse, D., Spiegelhalter, C., Schwab, Y., Le Merrer, J. i Kieffer, B. L. (2014). Autistic-like syndrome in mu opioid receptor null mice is relieved by facilitated mGluR4 activity. *Neuropsychopharmacology*, 39(9), 2049–2060.
- Belknap, J. K., Noordewier, B. i Lame, M. (1989). Genetic dissociation of multiple morphine effects among C57BL/6J, DBA/2J and C3H/HeJ inbred mouse strains. *Physiology & Behavior*, 46(1), 69–74.
- Belknap, J. K., Riggan, J., Cross, S., Young, E. R., Gallaher, E. J. i Crabbe, J. C. (1998). Genetic determinants of morphine activity and thermal responses in 15 inbred mouse strains. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 59(2), 353–360.
- Benyhe, S., Farkas, J., Tóth, G. i Wollemann, M. (1997). Met5-enkephalin-Arg6-Phe7, an endogenous neuropeptide, binds to multiple opioid and nonopioid sites in rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 48(3), 249–258.
- Berrocso, E., Ikeda, K., Sora, I., Uhl, G. R., Sánchez-Blázquez, P. i Mico, J. A. (2013). Active behaviours produced by antidepressants and opioids in the mouse tail suspension test. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(1), 151–162.
- Besse, D., Lombard, M. C., Zajac, J. M., Roques, B. P. i Besson, J. M. (1990). Pre- and postsynaptic distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Research*, 521(1–2), 15–22.
- Besson, A., Privat, A. M., Eschalier, A. i Fialip, J. (1996). Effects of morphine, naloxone and their interaction in the learned-helplessness paradigm in rats. *Psychopharmacology*, 123(1), 71–78.
- Besson, A., Privat, A. M., Eschalier, A. i Fialip, J. (1998). Reversal of learned helplessness by morphine in rats: Involvement of a dopamine mediation. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 60(2), 519–525.
- Bianchetti, A., Guidice, A., Nava, F. i Manara, L. (1986). Dissociation of morphine withdrawal diarrhea and jumping in mice by the peripherally selective opioid antagonist SR 58002 C. *Life Sciences*, 39(24), 2297–2303.
- Bilbey, D. L. J., Salem, H. i Grossman, M. H. (1960). The anatomical basis of the Straub phenomenon. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 15(4), 540–543.
- Bilecki, W. i Przewłocki, R. (2000). Effect of opioids on Ca²⁺/cAMP responsive element binding protein. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 60(4), 557–567.
- Bilkei-Gorzo, A., Racz, I., Michel, K., Mauer, D., Zimmer, A., Klingmüller, D. i Zimmer, A. (2008). Control of hormonal stress reactivity by the endogenous opioid system. *Psychoneuroendocrinology*, 33(4), 425–436.
- Blanco, C., Wiley, T. R. A., Lloyd, J. J., Lopez, M. F. i Volkow, N. D. (2020). America's opioid crisis: The need for an integrated public health approach. *Translational Psychiatry*, 10(1), 167.
- Blumenthal, D. K. i Garrison, J. C. (2015). Pharmacodynamics: Molecular Mechanisms of Drug Action. W: L. L. Brunton, B. A. Chabner i B. C. Knollmann (red.), *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics* (12. wyd.). McGraw-Hill Education.
- Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R., Lin, F. T., Lefkowitz, R. J. i Caron, M. G. (2000). Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature*, 408(6813), 720–723.

- Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R., Sotnikova, T. D., Medvedev, I. O., Lefkowitz, R. J., Dykstra, L. A. i Caron, M. G. (2003). Enhanced rewarding properties of morphine, but not cocaine, in beta(arrestin)-2 knock-out mice. *The Journal of Neuroscience*, 23(32), 10265–10273.
- Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., Peppel, K., Caron, M. G. i Lin, F. T. (1999). Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science*, 286(5449), 2495–2498.
- Bolanos, C. A., Garmsen, G. M., Clair, M. A. i McDougall, S. A. (1996). Effects of the kappa-opioid receptor agonist U-50,488 on morphine-induced place preference conditioning in the developing rat. *European Journal of Pharmacology*, 317(1), 1–8.
- Booth, M. (2013). *Opium: A History*. St. Martin's Publishing Group.
- Borgkvist, A., Usiello, A., Greengard, P. i Fisone, G. (2007). Activation of the cAMP/PKA/DARPP-32 signaling pathway is required for morphine psychomotor stimulation but not for morphine reward. *Neuropsychopharmacology*, 32(9), 1995–2003.
- Bourin, M. i Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 55–65.
- Brewin, C. R. (2011). The nature and significance of memory disturbance in posttraumatic stress disorder. *Annual Review of Clinical Psychology*, 7, 203–227.
- Browne, C. A., van Nest, D. S. i Lucki, I. (2015). Antidepressant-like effects of buprenorphine in rats are strain dependent. *Behavioural Brain Research*, 278, 385–392.
- Brownstein, M. J. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(12), 5391–5393.
- Bryant, R. A., Creamer, M., O'Donnell, M., Silove, D. i McFarlane, A. C. (2009). A study of the protective function of acute morphine administration on subsequent posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*, 65(5), 438–440.
- Cadet, P., Mantione, K. J. i Stefano, G. B. (2003). Molecular Identification and Functional Expression of μ_3 , a Novel Alternatively Spliced Variant of the Human μ Opiate Receptor Gene. *The Journal of Immunology*, 170(10), 5118–5123.
- Can, A., Dao, D. T., Arad, M., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C. i Gould, T. D. (2012). The Mouse Forced Swim Test. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 59, 3638.
- Castellano, C., Cestari, V., Cabib, S. i Puglisi-Allegra, S. (1994). The effects of morphine on memory consolidation in mice involve both D1 and D2 dopamine receptors. *Behavioral and Neural Biology*, 61(2), 156–161.
- Chan, P. i Lutfy, K. (2016). Molecular Changes in Opioid Addiction: The Role of Adenylyl Cyclase and cAMP/PKA System. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 137, 203–227.
- Charbogne, P., Kieffer, B. L. i Befort, K. (2014). 15 years of genetic approaches in vivo for addiction research: Opioid receptor and peptide gene knockout in mouse models of drug abuse. *Neuropharmacology*, 76, 204–217.
- Chavkin, C. (2018). Kappa-opioid antagonists as stress resilience medications for the treatment of alcohol use disorders. *Neuropsychopharmacology*, 43(9), 1803–1804.
- Che, T., Dwivedi-Agnihotri, H., Shukla, A. K. i Roth, B. L. (2021). Biased ligands at opioid receptors: Current status and future directions. *Science Signaling*, 14(677).

- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J. A. i Yu, L. (1993). Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Molecular Pharmacology*, 44(1), 8–12.
- Christie, M. J., Williams, J. T. i North, R. A. (1987). Cellular mechanisms of opioid tolerance: Studies in single brain neurons. *Molecular Pharmacology*, 32(5), 633–638.
- Commons, K. G., Cholanians, A. B., Babb, J. A i Ehlinger, D. G. (2017). The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(5), 955–960.
- Conibear, A. E., Asghar, J., Hill, R., Henderson, G., Borbely, E., Tekus, V., Helyes, Z., Palandri, J., Bailey, C., Starke, I., von Mentzer, B., Kendall, D i Kelly, E. (2020). A Novel G Protein-Biased Agonist at the δ Opioid Receptor with Analgesic Efficacy in Models of Chronic Pain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 372(2), 224–236.
- Contarino, A., Picetti, R., Matthes, H. W., Koob, G. F., Kieffer, B. L. i Gold, L. H. (2002). Lack of reward and locomotor stimulation induced by heroin in mu-opioid receptor-deficient mice. *European Journal of Pharmacology*, 446(1–3), 103–109.
- Contet, C., Kieffer, B. L. i Befort, K. (2004). Mu opioid receptor: A gateway to drug addiction. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(3), 370–378.
- Cordery, S. F., Taverner, A., Ridzwan, I. E., Guy, R. H., Delgado-Charro, M. B., Husbands, S. M. i Bailey, C. P. (2014). A non-rewarding, non-aversive buprenorphine/naltrexone combination attenuates drug-primed reinstatement to cocaine and morphine in rats in a conditioned place preference paradigm. *Addiction Biology*, 19(4), 575–586.
- Cowan, A., Kehner, G. B. i Inan, S. (2015). Targeting Itch with Ligands Selective for κ Opioid Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 226, 291–314.
- Darcq, E. i Kieffer, B. L. (2018). Opioid receptors: Drivers to addiction? *Nature Reviews Neuroscience*, 19(8), 499–514.
- Degenhardt, L., Grebely, J., Stone, J., Hickman, M., Vickerman, P., Marshall, B. D. L., Bruneau, J., Altice, F. L., Henderson, G., Rahimi-Movaghar, A. i Larney, S. (2019). Global patterns of opioid use and dependence: Harms to populations, interventions, and future action. *Lancet*, 394(10208), 1560–1579.
- Denis, C., Saulière, A., Galandrin, S., Sénard, J.-M. i Galés, C. (2012). Probing heterotrimeric G protein activation: Applications to biased ligands. *Current Pharmaceutical Design*, 18(2), 128–144.
- DeWire, S. M., Yamashita, D. S., Rominger, D. H., Liu, G., Cowan, C. L., Graczyk, T. M., Chen, X.-T., Pitis, P. M., Gotchev, D., Yuan, C., Koblish, M., Lark, M. W. i Violin, J. D. (2013). A G protein-biased ligand at the μ -opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 344(3), 708–717.
- Di Chiara, G. i Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(14), 5274–5278.
- Dietis, N., Rowbotham, D. J., i Lambert, D. G. (2011). Opioid receptor subtypes: Fact or artifact? *British Journal of Anaesthesia*, 107(1), 8–18.

- Ding, H., Kiguchi, N., Perrey, D. A., Nguyen, T., Czoty, P. W., Hsu, F.-C., Zhang, Y. i Ko, M.-C. (2020). Antinociceptive, reinforcing, and pruritic effects of the G-protein signalling-biased mu opioid receptor agonist PZM21 in non-human primates. *British Journal of Anaesthesia*, 125(4), 596–604.
- Drolet, G., Dumont, É. C., Gosselin, I., Kinkead, R., Laforest, S. i Trottier, J. F. (2001). Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(4), 729–741.
- Duarte, D. F. (2005). Opium and opioids: A brief history. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 55(1), 135–146.
- Dydyk, A. M., Jain, N. K. i Gupta, M. (2021). *Opioid Use Disorder*. StatPearls Publishing.
- Emery, M. A. i Akil, H. (2020). Endogenous opioids at the intersection of opioid addiction, pain, and depression: The search for a precision medicine approach. *Annual Review of Neuroscience*, 43, 355-374.
- Emrich, H. M., Vogt, P. i Herz, A. (1982). Possible antidepressive effects of opioids: Action of buprenorphine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 398, 108–112.
- Eschalier, A., Fialip, J., Varoquaux, O. i Makambila, M.-C. (1987). Study of the clomipramine-morphine interaction in the forced swimming test in mice. *Psychopharmacology*, 93(4), 515–519.
- Everitt, B. J. i Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: From actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience*, 8(11), 1481–1489.
- Falcon, E., Maier, K., Robinson, S. A., Hill-Smith, T. E. i Lucki, I. (2015). Effects of buprenorphine on behavioral tests for antidepressant and anxiolytic drugs in mice. *Psychopharmacology*, 232(5), 907–915.
- Farmer, A. D., Drewes, A. M., Chiarioni, G., De Giorgio, R., O'Brien, T., Morlion, B. i Tack, J. (2019). Pathophysiology and management of opioid-induced constipation: European expert consensus statement. *United European Gastroenterology Journal*, 7(1), 7–20.
- Faouzi, A., Varga, B. R. i Majumdar, S. (2020). Biased opioid ligands. *Molecules*, 25(18), 4257.
- FDA. *FDA Approves New Opioid for Intravenous Use in Hospitals, Other Controlled Clinical Settings*. 7.08.2020. Pobrane z: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-opioid-intravenous-use-hospitals-other-controlled-clinical-settings> (17.09.2021).
- Feige, C. i Miron, J. A. (2008). The opium wars, opium legalization and opium consumption in China. *Applied Economics Letters*, 15(12), 911–913.
- Fichna, J., Janecka, A., Piestrzeniewicz, M., Costentin, J. i do Rego, J. C. (2007). Antidepressant-Like Effect of Endomorphin-1 and Endomorphin-2 in Mice. *Neuropsychopharmacology*, 32(4), 813–821.
- Fields, H. (2004). State-dependent opioid control of pain. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(7), 565–575.
- Filliol, D., Ghazizadeh, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H. W., Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., Valverde, O., Maldonado, R. i Kieffer, B. L. (2000). Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nature Genetics*, 25(2), 195–200.
- Fossler, M. J., Sadler, B. M., Farrell, C., Burt, D. A., Pitsiu, M., Skobieranda, F. i Soergel, D. G. (2018). Oliceridine (TRV130), a Novel G Protein-Biased Ligand at the μ -Opioid Receptor, Demonstrates a Predictable Relationship Between Plasma

- Concentrations and Pain Relief. I: Development of a Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model. *Journal of Clinical Pharmacology*, 58(6), 750–761.
- Fricker, L. D., Margolis, E. B., Gomes, I. i Devi, L. A. (2020). Five decades of research on opioid peptides: current knowledge and unanswered questions. *Molecular Pharmacology*, 98(2), 96-108.
- Funada, M., Suzuki, T., Narita, M., Misawa, M. i Nagase, H. (1993). Blockade of morphine reward through the activation of kappa-opioid receptors in mice. *Neuropharmacology*, 32(12), 1315–1323.
- Gillis, A., Gondin, A. B., Kliewer, A., Sanchez, J., Lim, H. D., Alamein, C., Manandhar, P., Santiago, M., Fritzwanker, S., Schmiedel, F., Katte, T. A., Reekie, T., Grimsey, N. L., Kassiou, M., Kellam, B., Krasel, C., Halls, M. L., Connor, M., Lane, J. R., Schulz, S., Christie, M. J. i Canals, M. (2020a). Low intrinsic efficacy for G protein activation can explain the improved side effect profiles of new opioid agonists. *Science Signaling*, 13(625).
- Gillis, A., Sreenivasan, V. i Christie, M. J. (2020b). Intrinsic Efficacy of Opioid Ligands and Its Importance for Apparent Bias, Operational Analysis, and Therapeutic Window. *Molecular Pharmacology*, 98(4), 410–424.
- Gomes, I., Fujita, W., Gupta, A., Saldanha, S. A., Negri, A., Pinello, C. E., Eberhart, C., Roberts, E., Filizola, M., Hodder, P. i Devi, L. A. (2013). Identification of a μ - δ opioid receptor heteromer-biased agonist with antinociceptive activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29), 12072–12077.
- Green, T. A. i Bardo, M. T. (2020). Opposite regulation of conditioned place preference and intravenous drug self-administration in rodent models: Motivational and non-motivational examples. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 116, 89–98.
- Greene, M. S. i Chambers, R. A. (2015). Pseudoaddiction: Fact or Fiction? An Investigation of the Medical Literature. *Current Addiction Reports*, 2(4), 310–317.
- Grim, T. W., Acevedo-Canabal, A. i Bohn, L. M. (2020). Toward Directing Opioid Receptor Signaling to Refine Opioid Therapeutics. *Biological Psychiatry*, 87(1), 15–21.
- Grim, T. W., Schmid, C. L., Stahl, E. L., Pantouli, F., Ho, J.-H., Acevedo-Canabal, A., Kennedy, N. M., Cameron, M. D., Bannister, T. D. i Bohn, L. M. (2020). A G protein signaling-biased agonist at the μ -opioid receptor reverses morphine tolerance while preventing morphine withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, 45(2), 416–425.
- Haj-Mirzaian, A., Nikbakhsh, R., Ramezanzadeh, K., Rezaee, M., Amini-Khoei, H., Haj-Mirzaian, A., Ghesmati, M., Afshari, K., Haddadi, N. S. i Dehpour, A. R. (2019). Involvement of opioid system in behavioral despair induced by social isolation stress in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 938–944.
- Hall, F. S., Li, X. F., Goeb, M., Roff, S., Hoggatt, H., Sora, I. i Uhl, G. R. (2003). Congenic C57BL/6 mu opiate receptor (MOR) knockout mice: Baseline and opiate effects. *Genes, Brain, and Behavior*, 2(2), 114–121.
- He, L., Gooding, S. W., Lewis, E., Felth, L. C., Gaur, A. i Whistler, J. L. (2021). Pharmacological and genetic manipulations at the μ -opioid receptor reveal arrestin-3 engagement limits analgesic tolerance and does not exacerbate respiratory depression in mice. *Neuropsychopharmacology*, 46(13), 2241-2249.

- Hegadoren, K. M., O'Donnell, T., Lanius, R., Coupland, N. J. i Lacaze-Masmonteil, N. (2009). The role of beta-endorphin in the pathophysiology of major depression. *Neuropeptides*, 43(5), 341–353.
- Hill, R., Disney, A., Conibear, A., Sutcliffe, K., Dewey, W., Husbands, S., Bailey, C., Kelly, E. i Henderson, G. (2018). The novel μ -opioid receptor agonist PZM21 depresses respiration and induces tolerance to antinociception. *British Journal of Pharmacology*, 175(13), 2653–2661.
- Hnasko, T. S., Sotak, B. N. i Palmiter, R. D. (2005). Morphine reward in dopamine-deficient mice. *Nature*, 438(7069), 854–857.
- Hodgson, B. (2001). *In the arms of morpheus: The tragic history of laudanum, morphine, and patent medicines*. Firefly Books.
- Holbrook, T. L., Galarneau, M. R., Dye, J. L., Quinn, K. i Dougherty, A. L. (2010). Morphine use after combat injury in Iraq and post-traumatic stress disorder. *The New England Journal of Medicine*, 362(2), 110–117.
- Horvath, G. (2000). Endomorphin-1 and endomorphin-2: Pharmacology of the selective endogenous μ -opioid receptor agonists. *Pharmacology & Therapeutics*, 88(3), 437–463.
- Hurtado, I., García-Sempere, A., Peiró, S. i Sanfélix-Gimeno, G. (2020). Increasing Trends in Opioid Use From 2010 to 2018 in the Region of Valencia, Spain: A Real-World, Population-Based Study. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 2136.
- Ide, S., Sora, I., Ikeda, K., Minami, M., Uhl, G. R. i Ishihara, K. (2010). Reduced emotional and corticosterone responses to stress in μ -opioid receptor knockout mice. *Neuropharmacology*, 58(1), 241–247.
- Jacobson, M. L., Browne, C. A. i Lucki, I. (2020). Kappa Opioid Receptor Antagonists as Potential Therapeutics for Stress-Related Disorders. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 60, 615–636.
- Johnson, S. W. i North, R. A. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *The Journal of Neuroscience*, 12(2), 483–488.
- Kaczmarek, E. (2020) Epidemia, która zależy tylko od nas. O kryzysie uzależnień od leków w USA. *Kultura Liberalna*, 584.
- Kamieński, Ł. (2011). Wojna secesyjna, medycyna, opiaty i „żołnierska choroba”. *Kultura i Historia*, 20, 2.
- Kelly, E. (2013). Efficacy and ligand bias at the μ -opioid receptor. *British Journal of Pharmacology*, 169(7), 1430–1446.
- Kenakin, T. (2015). Gaddum Memorial Lecture 2014: receptors as an evolving concept: from switches to biased microprocessors. *British Journal of Pharmacology*, 172(17), 4238–4253.
- Kenakin, T. (2019). Biased Receptor Signaling in Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*, 71(2), 267–315.
- Khatri, U. G. i Perrone, J. (2020). Opioid Use Disorder and COVID-19: Crashing of the Crises. *Journal of Addiction Medicine*.
- Kida, S. (2019). Reconsolidation/destabilization, extinction and forgetting of fear memory as therapeutic targets for PTSD. *Psychopharmacology*, 236(1), 49–57.
- Klein, M. E., Chandra, J., Sheriff, S. i Malinow, R. (2020). Opioid system is necessary but not sufficient for antidepressive actions of ketamine in rodents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(5), 2656–2662.
- Kliwer, A., Gillis, A., Hill, R., Schmiedel, F., Bailey, C., Kelly, E., Henderson, G., Christie, M. J. i Schulz, S. (2020). Morphine-induced respiratory depression is

- independent of β -arrestin2 signalling. *British Journal of Pharmacology*, 177(13), 2923–2931.
- Kliwer, A., Schmiedel, F., Sianati, S., Bailey, A., Bateman, J. T., Levitt, E. S., Williams, J. T., Christie, M. J. i Schulz, S. (2019). Phosphorylation-deficient G-protein-biased μ -opioid receptors improve analgesia and diminish tolerance but worsen opioid side effects. *Nature Communications*, 10(1), 1-11.
- Koob, G. F. (1992). Drugs of abuse: Anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13, 177–184.
- Koob, G. F., Maldonado, R. i Stinus, L. (1992). Neural substrates of opiate withdrawal. *Trends in Neurosciences*, 15(5), 186–191.
- Kosten, T. A., Marby, D. W., & Nestler, E. J. (1991). Cocaine conditioned place preference is attenuated by chronic buprenorphine treatment. *Life Sciences*, 49(24), PL201-206. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90490-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90490-3)
- Kosten, T. R. i George, T. P. (2002). The Neurobiology of Opioid Dependence: Implications for Treatment. *Science & Practice Perspectives*, 1(1), 13–20.
- Kostowski, W. (2005). Uzależnienia: podstawowe pojęcia i teorie. *Psychiatria*, 2(2), 61-76.
- Kotlińska, J. i Rafalski, P. (2004). Nocyceptyna/orfanina FQ (N/OFQ) – opioid, antyopioid czy neuromodulator? *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 58, 209–215.
- Krishnamurti, C. i Rao, S. C. (2016). The isolation of morphine by Serturmer. *Indian Journal of Anaesthesia*, 60(11), 861–862.
- Kuhn, B. N., Kalivas, P. W. i Bobadilla, A. C. (2019). Understanding Addiction Using Animal Models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 262.
- Kumar, R., Viswanath, O. i Saadabadi, A. (2021). *Buprenorphine*. StatPearls Publishing.
- Kuppalli, S., Seth, R., Orhurhu, V., Urits, I., Kaye, A. D., Hunter, C., Gulati, A., Adekoya, P., Kaye, A. M. i Jones, M. R. (2021). Recent Advances in the Treatment of Opioid Use Disorder. *Current Pain and Headache Reports*, 25(4), 1-10.
- Kuzmin, A. V., Semenova, S., Gerrits, M. A., Zvartau, E. E. i Van Ree, J. M. (1997). Kappa-opioid receptor agonist U50,488H modulates cocaine and morphine self-administration in drug-naive rats and mice. *European Journal of Pharmacology*, 321(3), 265–271.
- Le Merrer, J., Becker, J. A. J., Befort, K. i Kieffer, B. L. (2009). Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiological Reviews*, 89(4), 1379–1412.
- Le Merrer, J., Cagniard, B. i Cazala, P. (2006). Modulation of anxiety by mu-opioid receptors of the lateral septal region in mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 83(3), 465–479.
- Li, W., Sun, H., Chen, H., Yang, X., Xiao, L., Liu, R., Shao, L. i Qiu, Z. (2016). Major Depressive Disorder and Kappa Opioid Receptor Antagonists. *Translational perioperative and pain medicine*, 1(2), 4–16.
- Liang, D. Y., Li, W. W., Nwaneshiudu, C., Irvine, K. A. i Clark, J. D. (2019). Pharmacological Characters of Oliceridine, a μ -Opioid Receptor G-Protein-Biased Ligand in Mice. *Anesthesia and Analgesia*, 129(5), 1414–1421.
- Liu, J. F. i Li, J. X. (2018). Drug addiction: A curable mental disorder? *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(12), 1823–1829.
- Lutz, P. E., Almeida, D., Filliol, D., Jollant, F., Kieffer, B. L. i Turecki, G. (2021). Increased functional coupling of the mu opioid receptor in the anterior insula of depressed individuals. *Neuropsychopharmacology*, 46(5), 920–927.

- Lutz, P. E. i Kieffer, B. L. (2013). Opioid receptors: Distinct roles in mood disorders. *Trends in Neurosciences*, 36(3), 195–206.
- Lyden, J. i Binswanger, I. A. (2019). The United States opioid epidemic. *Seminars in Perinatology*, 43(3), 123–131.
- Madia, P. A., Dighe, S. V., Sirohi, S., Walker, E. A. i Yoburn, B. C. (2009). Dosing protocol and analgesic efficacy determine opioid tolerance in the mouse. *Psychopharmacology*, 207(3), 413–422.
- Mague, S. D., Pliakas, A. M., Todtenkopf, M. S., Tomasiewicz, H. C., Zhang, Y., Stevens, W. C., Jones, R. M., Portoghese, P. S. i Carlezon, W. A. (2003). Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305(1), 323–330.
- Major, C. T. i Pleuvry, B. J. (1971). Effects of α -methyl-p-tyrosine, p-chlorophenylalanine, l- β -(3,4-dihydroxyphenyl)alanine, 5-hydroxytryptophan and diethyldithiocarbamate on the analgesic activity of morphine and methylamphetamine in the mouse. *British Journal of Pharmacology*, 42(4), 512–521.
- Maldonado, R., Stinus, L., Gold, L. H. i Koob, G. F. (1992). Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 261(2), 669–677.
- Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Mathiesen, J. M., Sunahara, R. K., Pardo, L., Weis, W. I., Kobilka, B. K. i Granier, S. (2012). Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, 485(7398), 321–326.
- Manglik, A., Lin, H., Aryal, D. K., McCorvy, J. D., Dengler, D., Corder, G., Levit, A., Kling, R. C., Bernat, V., Hübner, H., Huang, X.-P., Sassano, M. F., Giguère, P. M., Löber, S., Da Duan, Scherrer, G., Kobilka, B. K., Gmeiner, P., Roth, B. L. i Shoichet, B. K. (2016). Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature*, 537(7619), 185–190.
- Mansour, A., Fox, C. A., Burke, S., Akil, H. i Watson, S. J. (1995). Immunohistochemical localization of the cloned μ opioid receptor in the rat CNS. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 8(4), 283–305.
- Mansour, A., Fox, C. A., Thompson, R. C., Akil, H. i Watson, S. J. (1994). μ -Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: Comparison to μ -receptor binding. *Brain Research*, 643(1–2), 245–265.
- Martínez-Navarro, M., Maldonado, R. i Baños, J. E. (2019). Why mu-opioid agonists have less analgesic efficacy in neuropathic pain? *European Journal of Pain*, 23(3), 435–454
- Martyn, J. A. J., Mao, J. i Bittner, E. A. (2019). Opioid Tolerance in Critical Illness. *New England Journal of Medicine*, 380(4), 365–378.
- McKendrick, G. i Graziane, N. M. (2020). Drug-Induced Conditioned Place Preference and Its Practical Use in Substance Use Disorder Research. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14, 173.
- McNally, G. P. i Westbrook, R. F. (2003). Opioid receptors regulate the extinction of Pavlovian fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 117(6), 1292–1301.
- Montandon, G., Ren, J., Victoria, N. C., Liu, H., Wickman, K., Greer, J. J. i Horner, R. L. (2016). G-protein-gated Inwardly Rectifying Potassium Channels Modulate Respiratory Depression by Opioids. *Anesthesiology*, 124(3), 641–650.

- Mores, K. L., Cummins, B. R., Cassell, R. J. i van Rijn, R. M. (2019). A Review of the Therapeutic Potential of Recently Developed G Protein-Biased Kappa Agonists. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 407.
- Mori, T., Kuzumaki, N., Arima, T., Narita, M., Tateishi, R., Kondo, T., Hamada, Y., Kuwata, H., Kawata, M., Yamazaki, M., Sugita, K., Matsuzawa, A., Baba, K., Yamauchi, T., Higashiyama, K., Nonaka, M., Miyano, K., Uezono, Y. i Narita, M. (2017). Usefulness for the combination of G-protein- and β -arrestin-biased ligands of μ -opioid receptors: Prevention of antinociceptive tolerance. *Molecular Pain*, 13, 1744806917740030.
- Narayan, A. i Balkrishnan, R. (2021). A health crisis within a health crisis: Opioid access in the COVID-19 pandemic. *Substance Abuse*, 42(2), 148-152.
- National Collaborating Centre for Mental Health UK. (2008). *Drug misuse: psychosocial interventions*. British Psychological Society.
- Nath, C., Gupta, M. B., Patnaik, G. K. i Dhawan, K. N. (1994). Morphine-induced Straub tail response: Mediated by central μ 2-opioid receptor. *European Journal of Pharmacology*, 263(1), 203-205.
- Navailles, S. i De Deurwaerdère, P. (2011). Presynaptic control of serotonin on striatal dopamine function. *Psychopharmacology*, 213(2), 213-242.
- Nestler, E. J. (1996). Under Siege: The Brain on Opiates. *Neuron*, 16(5), 897-900.
- Nikolarakis, K. E., Almeida, O. F. i Herz, A. (1986). Stimulation of hypothalamic beta-endorphin and dynorphin release by corticotropin-releasing factor (in vitro). *Brain Research*, 399(1), 152-155.
- Noble, F., Lenoir, M. i Marie, N. (2015). The opioid receptors as targets for drug abuse medication. *British Journal of Pharmacology*, 172(16), 3964-3979.
- Onaran, H. O., Ambrosio, C., Uğur, Ö., Madaras Koncz, E., Grò, M. C., Vezzi, V., Rajagopal, S. i Costa, T. (2017). Systematic errors in detecting biased agonism: Analysis of current methods and development of a new model-free approach. *Scientific Reports*, 7, 44247.
- Orsini, C., Bonito-Oliva, A., Conversi, D. i Cabib, S. (2005). Susceptibility to conditioned place preference induced by addictive drugs in mice of the C57BL/6 and DBA/2 inbred strains. *Psychopharmacology*, 181(2), 327-336.
- Pantouli, F., Grim, T. W., Schmid, C. L., Acevedo-Canabal, A., Kennedy, N. M., Cameron, M. D., Bannister, T. D. i Bohn, L. M. (2021). Comparison of morphine, oxycodone and the biased MOR agonist SR-17018 for tolerance and efficacy in mouse models of pain. *Neuropharmacology*, 185, 108439.
- Parkitna, J. R., Solecki, W., Gołembiowska, K., Tokarski, K., Kubik, J., Gołda, S., Novak, M., Parlato, R., Hess, G., Sprengel, R. i Przewłocki, R. (2012). Glutamate input to noradrenergic neurons plays an essential role in the development of morphine dependence and psychomotor sensitization. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 15(10), 1457-1471.
- Pascoe, J. E., Williams, K. L., Mukhopadhyay, P., Rice, K. C., Woods, J. H. i Ko, M.-C. (2008). Effects of mu, kappa, and delta opioid receptor agonists on the function of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in monkeys. *Psychoneuroendocrinology*, 33(4), 478-486.
- Pathan, H. i Williams, J. (2012). Basic opioid pharmacology: An update. *British Journal of Pain*, 6(1), 11-16.
- Paxinos, G. i Franklin, K. B. J. (2019). *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.

- Pettit, H. O., Ettenberg, A., Bloom, F. E. i Koob, G. F. (1984). Destruction of dopamine in the nucleus accumbens selectively attenuates cocaine but not heroin self-administration in rats. *Psychopharmacology*, *84*(2), 167–173.
- Piotrowska, A., Starnowska-Sokół, J., Makuch, W., Mika, J., Witkowska, E., Tymecka, D., Ignaczak, A., Wilenska, B., Misicka, A. i Przewłocka, B. (2021). Novel bifunctional hybrid compounds designed to enhance the effects of opioids and antagonize the pronociceptive effects of nonopioid peptides as potent analgesics in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, *162*(2), 432–445.
- Pitman, R. K., Rasmusson, A. M., Koenen, K. C., Shin, L. M., Orr, S. P., Gilbertson, M. W., Milad, M. R. i Liberzon, I. (2012). Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nature Reviews. Neuroscience*, *13*(11), 769–787.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M. i Jalfre, M. (1977). Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, *266*(5604), 730–732.
- Pradhan, A. A., Befort, K., Nozaki, C., Gavériaux-Ruff, C. i Kieffer, B. L. (2011). The delta opioid receptor: An evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends in pharmacological sciences*, *32*(10), 581–590.
- Przewłocka, B., Sieja, A., Starowicz, K., Maj, M., Bilecki, W. i Przewłocki, R. (2002). Knockdown of spinal opioid receptors by antisense targeting β -arrestin reduces morphine tolerance and allodynia in rat. *Neuroscience Letters*, *325*(2), 107–110.
- Przewłocki, R. (2002). 12—Stress, Opioid Peptides, and Their Receptors. W: D. W. Pfaff, A. P. Arnold, S. E. Fahrbach, A. M. Etgen i R. T. Rubin (red.), *Hormones, Brain and Behavior* (s. 691–733). Academic Press.
- Przewłocki, R. i Almeida, O. F. X. (2017). Stress and Opioid Systems. W: D. W. Pfaff (red.) *Hormones, Brain and Behavior; Vol. 1 Mammalian hormone-behavior systems* (s.225-260). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Puryear, C. B., Brooks, J., Tan, L., Smith, K., Li, Y., Cunningham, J., Todtenkopf, M. S., Dean, R. L. i Sanchez, C. (2020). Opioid receptor modulation of neural circuits in depression: What can be learned from preclinical data? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *108*, 658–678.
- Raehal, K. M. i Bohn, L. M. (2011). The role of beta-arrestin2 in the severity of antinociceptive tolerance and physical dependence induced by different opioid pain therapeutics. *Neuropharmacology*, *60*(1), 58–65.
- Raehal, K. M. i Bohn, L. M. (2014). β -Arrestins: Regulatory Role and Therapeutic Potential in Opioid and Cannabinoid Receptor-Mediated Analgesia. W: V. V. Gurevich (red.), *Arrestins—Pharmacology and Therapeutic Potential* (s. 427–443). Springer.
- Raehal, K. M., Walker, J. K. L. i Bohn, L. M. (2005). Morphine Side Effects in β -Arrestin 2 Knockout Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *314*(3), 1195–1201.
- Robinson, T. E. i Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *18*(3), 247–291.
- Rothman, R. B., Blough, B. E. i Baumann, M. H. (2008). Dual dopamine/serotonin releasers: Potential treatment agents for stimulant addiction. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, *16*(6), 458–474.
- Russell, W. M. S. i Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen.

- Saito, H. (1990). Inhibitory and stimulatory effects of morphine on locomotor activity in mice: Biochemical and behavioral studies. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 35(1), 231–235.
- Samuels, B. A., Nautiyal, K. M., Kruegel, A. C., Levinstein, M. R., Magalong, V. M., Gassaway, M. M., Grinnell, S. G., Han, J., Ansonoff, M. A., Pintar, J. E., Javitch, J. A., Sames, D. i Hen, R. (2017). The Behavioral Effects of the Antidepressant Tianeptine Require the Mu-Opioid Receptor. *Neuropsychopharmacology*, 42(10), 2052–2063.
- Saxe, G., Stoddard, F., Courtney, D., Cunningham, K., Chawla, N., Sheridan, R., King, D., i King, L. (2001). Relationship Between Acute Morphine and the Course of PTSD in Children With Burns. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 40(8), 915–921.
- Schattauer, S. S., Kuhar, J. R., Song, A. i Chavkin, C. (2017). Nalfurafine is a G-protein biased agonist having significantly greater bias at the human than rodent form of the kappa opioid receptor. *Cellular Signalling*, 32, 59-65.
- Schmid, C. L., Kennedy, N. M., Ross, N. C., Lovell, K. M., Yue, Z., Morgenweck, J., Cameron, M. D., Bannister, T. D. i Bohn, L. M. (2017). Bias factor and therapeutic window correlate to predict safer opioid analgesics. *Cell*, 171(5), 1165-1175.
- Schwienteck, K. L., Faunce, K. E., Rice, K. C., Obeng, S., Zhang, Y., Blough, B. E., Grim, T. W., Negus, S. S. i Banks, M. L. (2019). Effectiveness comparisons of G-protein biased and unbiased mu opioid receptor ligands in warm water tail-withdrawal and drug discrimination in male and female rats. *Neuropharmacology*, 150, 200–209.
- Serafini, G., Adavastro, G., Canepa, G., De Berardis, D., Valchera, A., Pompili, M., Nasrallah, H. i Amore, M. (2018). The Efficacy of Buprenorphine in Major Depression, Treatment-Resistant Depression and Suicidal Behavior: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2410.
- Shemano, I. i Wendel, H. (1964). A rapid screening test for potential addiction liability of new analgesic agents. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 6(3), 334–339.
- Shin, I. C., Kim, H. C., Swanson, J., Hong, J. T. i Oh, K. W. (2003). Anxiolytic Effects of Acute Morphine Can Be Modulated by Nitric Oxide Systems. *Pharmacology*, 68(4), 183–189.
- Shirayama, Y., Ishida, H., Iwata, M., Hazama, G. I., Kawahara, R. i Duman, R. S. (2004). Stress increases dynorphin immunoreactivity in limbic brain regions and dynorphin antagonism produces antidepressant-like effects. *Journal of Neurochemistry*, 90(5), 1258–1268.
- Sikora, M., Tokarski, K., Bobula, B., Zajdel, J., Jastrzębska, K., Cieślak, P. E., Zygmunt, M., Sowa, J., Smutek, M., Kamińska, K., Gołembowska, K., Engblom, D., Hess, G., Przewłocki, R. i Parkitna, J. R. (2016). NMDA Receptors on Dopaminergic Neurons Are Essential for Drug-Induced Conditioned Place Preference. *ENeuro*, 3(3).
- Sim, S. K. (1973). Methadone. *Canadian Medical Association Journal*, 109(7), 615–619.
- Singla, N. K., Skobieranda, F., Soergel, D. G., Salamea, M., Burt, D. A., Demitrack, M. A. i Viscusi, E. R. (2019). APOLLO-2: A Randomized, Placebo and Active-Controlled Phase III Study Investigating Oliceridine (TRV130), a G Protein-Biased Ligand at the μ -Opioid Receptor, for Management of Moderate to Severe Acute Pain Following Abdominoplasty. *Pain Practice: The Official Journal of World Institute of Pain*, 19(7), 715–731.

- Skolnick, P. (2018). The Opioid Epidemic: Crisis and Solutions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58, 143–159.
- Skupio, U., Sikora, M., Korostynski, M., Wawrzczak-Bargiela, A., Piechota, M., Ficek, J. i Przewłocki, R. (2017). Behavioral and transcriptional patterns of protracted opioid self-administration in mice. *Addiction Biology*, 22(6), 1802–1816.
- Smith, J. S., Lefkowitz, R. J. i Rajagopal, S. (2018). Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nature reviews Drug discovery*, 17(4), 243–260.
- Smith, J. S., Pack, T. F., Inoue, A., Lee, C., Zheng, K., Choi, I., Eiger, D. S., Warman, A., Xiong, X., Ma, Z., Viswanathan, G., Levitan, I. M., Rochelle, L. K., Staus, D. P., Snyder, J. C., Kahsai, A. W., Caron, M. G. i Rajagopal, S. (2021). Noncanonical scaffolding of G α i and β -arrestin by G protein-coupled receptors. *Science*, 371(6534).
- Sobczak, M., Sałaga, M., Storr, M. A. i Fichna, J. (2014). Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: Current concepts and future perspectives. *Journal of Gastroenterology*, 49(1), 24–45.
- Soergel, D. G., Subach, R. A., Burnham, N., Lark, M. W., James, I. E., Sadler, B. M., Skobieranda, F., Violin, J. D. i Webster, L. R. (2014). Biased agonism of the μ -opioid receptor by TRV130 increases analgesia and reduces on-target adverse effects versus morphine: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study in healthy volunteers. *Pain*, 155(9), 1829–1835.
- Soergel, D. G., Subach, R. A., Sadler, B., Connell, J., Marion, A. S., Cowan, C. L., Violin, J. D. i Lark, M. W. (2014). First clinical experience with TRV130: Pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*, 54(3), 351–357.
- Solecki, W. B., Kus, N., Gralec, K., Klasa, A., Pradel, K. i Przewłocki, R. (2019). Noradrenergic and corticosteroid receptors regulate somatic and motivational symptoms of morphine withdrawal. *Behavioural Brain Research*, 360, 146–157.
- Solecki, W. B., Szklarczyk, K., Pradel, K., Kwiatkowska, K., Dobrzański, G. i Przewłocki, R. (2018). Noradrenergic signaling in the VTA modulates cocaine craving. *Addiction Biology*, 23(2), 596–609.
- Solecki, W., Turek, A., Kubik, J. i Przewłocki, R. (2009). Motivational effects of opiates in conditioned place preference and aversion paradigm—A study in three inbred strains of mice. *Psychopharmacology*, 207(2), 245–255.
- Solecki, W., Wickham, R. J., Behrens, S., Wang, J., Zwerling, B., Mason, G. F. i Addy, N. A. (2013). Differential role of ventral tegmental area acetylcholine and N-methyl-D-aspartate receptors in cocaine-seeking. *Neuropharmacology*, 75, 9–18.
- Spahn, V., Del Vecchio, G., Labuz, D., Rodriguez-Gaztelumendi, A., Massaly, N., Temp, J., Durmaz, V., Sabri, P., Reidelbach, M., Machelska, H., Weber, M. i Stein, C. (2017). A nontoxic pain killer designed by modeling of pathological receptor conformations. *Science*, 355(6328), 966–969.
- Spahn, V., Del Vecchio, G., Rodriguez-Gaztelumendi, A., Temp, J., Łabuz, D., Kloner, M., Reidelbach, M., Machelska, H., Weber, M. i Stein, C. (2018). Opioid receptor signaling, analgesic and side effects induced by a computationally designed pH-dependent agonist. *Scientific Reports*, 8(1), 8965.
- Spanagel, R. (2017). Animal models of addiction. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(3), 247–258.

- Spanagel, R., Herz, A. i Shippenberg, T. S. (1990). The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: An in vivo microdialysis study. *Journal of Neurochemistry*, 55(5), 1734–1740.
- Stahl, E. L., Schmid, C. L., Acevedo-Canabal, A., Read, C., Grim, T. W., Kennedy, N. M., Bannister, T. D. i Bohn, L. M. (2021). G protein signaling–biased mu opioid receptor agonists that produce sustained G protein activation are noncompetitive agonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(48), e2102178118.
- Stein, C. i Lang, L. J. (2009). Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(1), 3–8.
- Stevens, C. W. i Yaksh, T. L. (1989). Potency of infused spinal antinociceptive agents is inversely related to magnitude of tolerance after continuous infusion. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 250(1), 1–8.
- Straub, W. (1911). Eine empfindliche biologische Reaktion auf Morphin. *Dtsch Med Wochenschr*, 37, 1462.
- Szklarczyk, K., Korostynski, M., Cieślak, P. E., Wawrzczak-Bargieła, A. i Przewłocki, R. (2015). Opioid-dependent regulation of high and low fear responses in two inbred mouse strains. *Behavioural Brain Research*, 292, 95–101.
- Szklarczyk, K., Korostynski, M., Golda, S., Piechota, M., Ficek, J. i Przewłocki, R. (2016). Endogenous opioids regulate glucocorticoid-dependent stress-coping strategies in mice. *Neuroscience*, 330, 121–137.
- Tallarida, R. i Murray, R. B. (1987). *Manual of Pharmacologic Calculations: With Computer Programs* (2. wyd.). Springer-Verlag.
- Tao, P. L., Liang, K. W., Sung, W. Y., Wu, Y. T. i Huang, E. Y. K. (2006). Nalbuphine is effective in decreasing the rewarding effect induced by morphine in rats. *Drug and Alcohol Dependence*, 84(2), 175–181.
- Tejedor-Real, P., Mico, J. A., Maldonado, R., Roques, B. P. i Gibert-Rahola, J. (1995). Implication of endogenous opioid system in the learned helplessness model of depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52(1), 145–152.
- Tertil, M., Skupio, U., Kudła, Ł., Wiktorowska, Ł. i Przewłocki, R. (2021). Astroglial Knockout of Glucocorticoid Receptor Attenuates Morphine Withdrawal Symptoms, but Not Antinociception and Tolerance in Mice. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1-4.
- Traynor, J. R. i Nahorski, S. R. (1995). Modulation by mu-opioid agonists of guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate binding to membranes from human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Molecular Pharmacology*, 47(4), 848–854.
- Trescot, A. M., Datta, S., Lee, M., & Hansen, H. (2008). Opioid pharmacology. *Pain Physician*, 11(2 Suppl), 133-153.
- Trigo, J. M., Martin-García, E., Berrendero, F., Robledo, P. i Maldonado, R. (2010). The endogenous opioid system: A common substrate in drug addiction. *Drug and Alcohol Dependence*, 108(3), 183–194.
- Tsuji, M., Takeda, H., Matsumiya, T., Nagase, H., Narita, M. i Suzuki, T. (2001). The novel kappa-opioid receptor agonist TRK-820 suppresses the rewarding and locomotor-enhancing effects of morphine in mice. *Life Sciences*, 68(15), 1717–1725.
- Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: Update of the last decade. *Addiction Biology*, 12(3–4), 227–462.

- Uchtenhagen, A. (2003). Substitution management in opioid dependence. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 66, 33–60.
- Upp, L. A. i Waljee, J. F. (2020). The Opioid Epidemic. *Clinics in Plastic Surgery*, 47(2), 181–190.
- Urs, N. M., Daigle, T. L. i Caron, M. G. (2011). A Dopamine D1 Receptor-Dependent β -Arrestin Signaling Complex Potentially Regulates Morphine-Induced Psychomotor Activation but not Reward in Mice. *Neuropsychopharmacology*, 36(3), 551–558.
- U.S. Department of Health and Human Services. 12.02.2021. *Opioid Crisis Statistics*. Pobrane z: <https://www.hhs.gov/opioids/about-the-epidemic/opioid-crisis-statistics/index.html> (17.09.2021).
- Valentino, R. J. i Van Bockstaele, E. (2014). Endogenous opioids: The downside of opposing stress. *Neurobiology of Stress*, 1, 23–32.
- Váradi, A., Marrone, G. F., Palmer, T. C., Narayan, A., Szabó, M. R., Le Rouzic, V., Grinnell, S. G., Subrath, J. J., Warner, E., Kalra, S., Hunkele, A., Pagirsky, J., Eans, S. O., Medina, J. M., Xu, J., Pan, Y. X., Borics, A., Pasternak, G. W., McLaughlin, J. P. i Majumdar, S. (2016). Mitragynine/Corynantheidine Pseudoindoxyls As Opioid Analgesics with Mu Agonism and Delta Antagonism, Which Do Not Recruit β -Arrestin-2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(18), 8381–8397.
- Verhamme, K. M. C. i Bohnen, A. M. (2019). Are we facing an opioid crisis in Europe? *The Lancet. Public Health*, 4(10), 483–484.
- Viscusi, E. R., Webster, L., Kuss, M., Daniels, S., Bolognese, J. A., Zuckerman, S., Soergel, D. G., Subach, R. A., Cook, E. i Skobieranda, F. (2016). A randomized, phase 2 study investigating TRV130, a biased ligand of the μ -opioid receptor, for the intravenous treatment of acute pain. *Pain*, 157(1), 264–272.
- Wang, J. B., Johnson, P. S., Persico, A. M., Hawkins, A. L., Griffin, C. A. i Uhl, G. R. (1994). Human mu opiate receptor. CDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Letters*, 338(2), 217–222.
- Wang, S. C., Chen, Y. C., Lee, C. H. i Cheng, C. M. (2019). Opioid Addiction, Genetic Susceptibility, and Medical Treatments: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4294.
- Williams, J. T., Ingram, S. L., Henderson, G., Chavkin, C., Zastrow, M. von, Schulz, S., Koch, T., Evans, C. J. i Christie, M. J. (2013). Regulation of μ -Opioid Receptors: Desensitization, Phosphorylation, Internalization, and Tolerance. *Pharmacological Reviews*, 65(1), 223–254.
- Wilson, L. L., Chakraborty, S., Eans, S. O., Cirino, T. J., Stacy, H. M., Simons, C. A., Uprety, R., Majumdar, S. i McLaughlin, J. P. (2021). Kratom Alkaloids, Natural and Semi-Synthetic, Show Less Physical Dependence and Ameliorate Opioid Withdrawal. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 41(5), 1131–1143.
- Wilson, M. A. i Junor, L. (2008). The role of amygdalar mu-opioid receptors in anxiety-related responses in two rat models. *Neuropsychopharmacology*, 33(12), 2957–2968.
- Wingler, L. M. i Lefkowitz, R. J. (2020). Conformational Basis of G Protein-Coupled Receptor Signaling Versatility. *Trends in Cell Biology*, 30(9), 736–747.
- Wise, R. A. i Koob, G. F. (2014). The development and maintenance of drug addiction. *Neuropsychopharmacology*, 39(2), 254–262.
- Yaksh, T. L. i Rudy, T. A. (1976). Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiology & Behavior*, 17(6), 1031–1036.

- Yaksh, T., i Wallace, M. (2017). Opioids, Analgesia, and Pain Management. W: L. L. Brunton, R. Hilal-Dandan i B. C. Knollmann (red.), *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics* (13. wyd.). McGraw-Hill Education.
- Yang, C. H., Huang, H. W., Chen, K. H., Chen, Y. S., Sheen-Chen, S. M. i Lin, C. R. (2011). Antinociceptive potentiation and attenuation of tolerance by intrathecal β -arrestin 2 small interfering RNA in rats. *British Journal of Anaesthesia*, 107(5), 774–781.
- Young, R. (2009). Drug Discrimination. W: J. J. Buccafusco (red.), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience* (2 wyd.). CRC Press/Taylor & Francis.
- Yudin, Y. i Rohacs, T. (2019). The G-protein-biased agents PZM21 and TRV130 are partial agonists of μ -opioid receptor-mediated signalling to ion channels. *British Journal of Pharmacology*, 176(17), 3110–3125.
- Yung-Chi, C. i Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology*, 22(23), 3099-3108.
- Zarrindast, M.-R. i Zarghi, A. (1992). Morphine stimulates locomotor activity by an indirect dopaminergic mechanism: Possible D-1 and D-2 receptor involvement. *General Pharmacology: The Vascular System*, 23(6), 1221–1225.
- Zelek-Molik, A., Costanzi, M., Rafa-Zabłocka, K., Kreiner, G., Roman, A., Vetulani, J., Rossi-Arnaud, C., Cestari, V. i Nalepa, I. (2019). Fear memory-induced alterations in the mRNA expression of G proteins in the mouse brain and the impact of immediate posttraining treatment with morphine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 93, 221-231.
- Zhang, L., Zhang, J. T., Hang, L. i Liu, T. (2020). Mu Opioid Receptor Heterodimers Emerge as Novel Therapeutic Targets: Recent Progress and Future Perspective. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1078.
- Zheng, W. (2010). Activation of mu opioid receptor inhibits the excitatory glutamatergic transmission in the anterior cingulate cortex of the rats with peripheral inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 628(1–3), 91–95.
- Zomkowski, A. D. E., Santos, A. R. S. i Rodrigues, A. L. S. (2005). Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Neuroscience Letters*, 381(3), 279–283.
- Zubieta, J. K., Smith, Y. R., Bueller, J. A., Xu, Y., Kilbourn, M. R., Jewett, D. M., Meyer, C. R., Koeppe, R. A. i Stohler, C. S. (2001). Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain. *Science*, 293(5528), 311–315.
- Zwierzyńska, E. i Pietrzak, B. (2014). Patogeneza uzależnień – problem wciąż aktualny. *Alcoholism and Drug Addiction*, 27(2), 163–175.

Spis tabel

Tabela 1. Receptory opioidowe – podstawowe informacje.	17
Tabela 2. Selektywni funkcjonalnie agoniści receptora opioidowego μ wybrani do badań własnych – dane z prac opisujących odkrycie związków.	36
Tabela 3. Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach.	41
Tabela 4. Rozplanowanie i liczebność grup eksperymentalnych.	43
Tabela 5. Dawki ED ₅₀ badanych agonistów.	67
Tabela 6. Powinowactwo badanych agonistów do receptorów opioidowych.	96
Tabela 7. Aktywacja białka G przez PZM21 w teście wiązania [³⁵ S]GTP γ S.	97
Tabela 8. Zestawienie uzyskanych wyników.	99

Spis rycin

Rycina 1. Sygnalizacja wewnątrzkomórkowa i jej regulacja na przykładzie receptora opioidowego μ	20
Rycina 2. Schematyczne rozmieszczenie receptorów μ w mózgu szczura	22
Rycina 3. Hipoteza dotycząca efektów in vivo agonistów receptora opioidowego μ selektywnych funkcjonalnie wobec białka G.	33
Rycina 4. Struktury chemiczne selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora μ wybranych do badań.	36
Rycina 5. Antynocyceptywny efekt PZM21 w teście odsuwania ogona.	60
Rycina 6. Antynocyceptywny efekt PZM21 w teście gorącej płytki.	61
Rycina 7. Antynocyceptywne działanie PZM21 w teście odsuwania ogona po podaniu nardzeniowym.	62
Rycina 8. Wpływ cyprodime na antynocyceptywne działanie PZM21 w teście odsuwania ogona.....	62
Rycina 9. Wpływ cyprodime na antynocyceptywne działanie PZM21 w teście gorącej płytki.	63
Rycina 10. Antynocyceptywne działanie SR-14968 w teście odsuwania ogona	64
Rycina 11. Antynocyceptywne działanie SR-14968 w teście gorącej płytki.	65
Rycina 12. Antynocyceptywne działanie SR-17018 w teście odsuwania ogona.	66
Rycina 13. Antynocyceptywne działanie SR-17018 w teście gorącej płytki.	67
Rycina 14. Tolerancja na antynocyceptywne działanie PZM21	68
Rycina 15. Zależność fizyczna i zespół odstawienia precypitowanego naloksonem po chronicznych podaniach PZM21.	69
Rycina 16. Aktywność lokomotoryczna po jednorazowym podaniu PZM21.	71
Rycina 17. Aktywność lokomotoryczna w przebiegu wielokrotnych podań PZM21.	72
Rycina 18. Działanie PZM21 w teście warunkowanej preferencji miejsca.	73
Rycina 19. Efekty PZM21 w procedurze dożylnego samopodawania substancji.....	74
Rycina 20. Poszukiwanie substancji w okresie wymuszonej abstynencji od PZM21.....	75

Rycina 21. Tolerancja na antynocyceptywne działanie SR-14968 i SR-17018.	76
Rycina 22. Zależność fizyczna i zespół odstawienia precypitowanego naloksonem po chronicznych podaniach SR-14968 i SR-17018.	77
Rycina 23. Aktywność lokomotoryczna po jednorazowych podaniach SR-14968 i SR-17018.	78
Rycina 24. Aktywność lokomotoryczna w trakcie wielokrotnych podań SR-14968 i SR-17018.	80
Rycina 25. Działanie SR-14968 i SR-17018 w teście warunkowanej preferencji miejsca.	80
Rycina 26. Wpływ PZM21 na antynocyceptywny efekt morfiny.	81
Rycina 27. Wpływ PZM21 na tolerancję na antynocyceptywne działanie morfiny. ...	82
Rycina 28. Wpływ PZM21 na objawy zespołu odstawienia precypitowanego naloksonem u myszy uzależnionych od morfiny.	83
Rycina 29. Wpływ PZM21 na warunkowaną preferencję miejsca wywołaną morfiną.	84
Rycina 30. Wpływ SR-14968 i SR-17018 na antynocyceptywny efekt morfiny.	85
Rycina 31. Wpływ SR-14968 i SR-17018 na tolerancję na antynocyceptywne działanie morfiny.	85
Rycina 32. Wpływ SR-14968 i SR-17018 na objawy zespołu odstawienia precypitowanego naloksonem u myszy uzależnionych od morfiny.	86
Rycina 33. Efekty PZM21 w teście wymuszonego pływania.	88
Rycina 34. Efekty PZM21 w teście zawieszenia za ogon.	89
Rycina 35. Wpływ PZM21 na lękowość w teście jasnego/ciemnego pudełka.	90
Rycina 36. Działanie PZM21 w teście warunkowania strachem.	91
Rycina 37. Wpływ PZM21 na pamięć roboczą w teście labiryntu w kształcie litery Y.	93
Rycina 38. Wpływ PZM21 na konsolidację pamięci długotrwałej w teście rozpoznawania nowego obiektu.	93
Rycina 39. Zewnątrzkomórkowy poziom dopaminy w prążkowie po jednorazowym podaniu PZM21.	94
Rycina 40. Zewnątrzkomórkowy poziom serotoniny w prążkowie po jednorazowym podaniu PZM21.	95

Spis rycin

Rycina 41. Aktywacja białka G przez PZM21 w teście wiązania [³⁵S]GTPγS.97

Rycina 42. Wpływ jednorazowego podania badanych substancji na występowanie reakcji Strauba. 98

Wykaz wybranych skrótów

β -arr2, ang. *β -arrestin-2* – β -arestyna-2

5-HT, ang. *5-hydroxytryptamine* - 5-hydrokсыtryptamina, serotonina

AAR, ang. *alternate arm returns* – 2 kolejne wejścia do różnych ramion labiryntu w kształcie litery Y

AUC, ang. *area under curve* – pole pod krzywą

cAMP, ang. *cyclic adenosine monophosphate* - cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan

CREB, ang. *cyclic AMP-responsive element binding* - białko wiążące element odpowiedzi cAMP

CRF, ang. *corticotropin-releasing factor* – czynnik uwalniający kortykotropinę/kortykoliberyna

Cyp – cyprodime

DA, ang. *dopamine* – dopamina

E_{max}, ang. *maximum effect* – maksymalny możliwy efekt określonej substancji

EC₅₀, ang. *half maximal effective concentration* - połowa maksymalnego skutecznego stężenia określonej substancji

ED₅₀, ang. *median effective dose* – dawka określonej substancji wywołująca odpowiedź biologiczną u 50% testowanych osobników

ERK, ang. *extracellular signal-regulated kinases* - zewnątrzkomórkowe kinazy regulowane sygnałem

FDA, ang. *Food and Drug Administration* - Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków

GIRK, ang. *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels* – wewnątrzprostownicze kanały potasowe aktywowane przez białko G

GPCR, ang. *G protein-coupled receptors, GPCR* – receptory związane z białkiem G

Wykaz wybranych skrótów

GRK, ang. *G protein-coupled receptor kinases* – kinazy receptorowe zależne od białka G

HPA, ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis* – oś podwzgórze-przysadka-nadnercza

HPLC, ang. *high performance liquid chromatography* - wysokosprawna chromatografia cieczowa

Ip., ang. *intraperitoneal* – podanie dootrzewnowe

Ith., ang. *intrathecal* – podanie nardzeniowe

MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinases* – kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny

Morf – morfina

MPE, ang. *maximal possible effect* – maksymalny możliwy efekt (w pomiarze antynocycepcji)

NLX, ang. *naloxone* – nalokson

ORL-1, ang. *opioid receptor-like 1* – receptor opioidopodobny (nocyceptynowy)

OUD, ang. *opioid use disorder* - zaburzenia związane z używaniem opioidów

Oxy, ang. *oxycodone* – oksykodon

PKA, ang. *protein kinase A* – kinaza białkowa A

PTSD, ang. *posttraumatic stress disorder* – zespół stresu pourazowego

Rozpuszcz. – rozpuszczalnik (1% DMSO, 10% Kolliphor HS 15, 89% dH₂O) wykorzystany do rozpuszczenia związków SR-14968 i SR-17018

Sól fizj. – sól fizjologiczna (0,9% NaCl)

SAP, ang. *spontaneous alteration performance* – 3 kolejne wejścia do różnych ramion labiryntu w kształcie litery Y

Wykaz wybranych skrótów

SAR, ang. *same arm returns* – 2 kolejne wejścia do tego samego ramienia labiryntu w kształcie litery Y

Sc., ang. *subcutaneous* – podanie podskórne

VGCC, ang. *voltage-gated calcium channels* – kanały wapniowe bramkowane napięciem