

Antinociceptive effects of morphine, nefopam, indomethacin and imipramine in rats with lesion of the central serotonergic system

Przeciwbólowe efekty morfiny, nefopamu, indometacyny i imipraminy u szczurów z lezją ośrodkowego układu serotonergicznego

Eva Kőrössi, Michał Świerszcz, Elżbieta Nowak, Magdalena Beška, Michał Bałasz, Przemysław Nowak, Ryszard Szkilnik

ABSTRACT

BACKGROUND

The aim of the present study was to examine the effect of the central serotonergic lesion on the antinociceptive effects of morphine (5.0 mg/kg sc), nefopam (20 mg/kg ip), indomethacin (5.0 mg/kg ip) and imipramine (10 mg/kg ip) in the model of exteroceptive sensation - formalin test (chemical stimulus), and interoceptive sensation - writhing test (model of visceral pain). Furthermore monoamine synthesis rate after examined analgetics in the frontal cortex, thalamus, brain stem and spinal cord was assayed.

MATERIAL AND METHODS

On the 3rd day of postnatal life male rats were administered with 5.7-DHT (70 µg/10 µl in 0.1% ascorbic acid solution ICV; 35 µg/5 µl per side); control animals received vehicle (70 µg/10 µl of 0.1% ascorbic acid solution ICV). Rats continued to be housed until 8-10 weeks, for further experimentation.

RESULTS

It was shown that the central serotonergic lesion slightly modified analgesia evoked by nefopam and indomethacin in formalin test but much more profound reduction in analgesia produced by morphine and indomethacin injection was observed in visceral model of nociception. In biochemical study it was shown that analgetics employed in this study (with exception of indomethacin) altered synthesis rate of serotonin (5-HT) and dopamine (DA) in the examined parts of the rats brain. The above indicates that besides serotonergic pathway other monoaminergic systems (noradrenergic and dopaminergic) participate in the central mechanism of action of these drugs.

Department of Pharmacology,
Medical University of Silesia,
Zabrze, Poland

ADRES

DO KORESPONDENCJI:
Prof. dr hab. n. med. Przemysław Nowak
Katedra i Zakład Farmakologii SUM
w Katowicach
41-808 Zabrze, ul. H. Jordana 88
tel./faks: +(48 32) 272 26 83
e-mail: pnowak@sum.edu.pl

Ann.Acad.Med.Siles. 2009, 63, 5, 7-24
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ISSN 0208-5607

CONCLUSION

It is likely that similar nociception abnormalities may occur in patients with serotonergic system dysfunction, so that it points out on the requirement of analgetics dosage adjustment.

KEY WORDS

lesion, central serotonergic system, pain, morphine, nefopam, indomethacin, imipramine, rats.

STRESZCZENIE**WSTĘP**

Celem pracy była ocena wpływu lezji (zniszczenia) ośrodkowego układu serotonergicznego na przeciwbólowe działanie morfiny (5.0 mg/kg sc), nefopamu (20 mg/kg ip), indometacyny (5.0 mg/kg ip) i imipraminy (10 mg/kg ip) w testach czucia bólu eksteroceptywnego, tj. formalinowym (bodziec chemiczny) a ponadto czucia interoceptywnego, tj. bólu trzewnego w teście wicia. Ponadto zbadano wpływ stosowanych analgetyków na procesy syntezy monoamin w wybranych częściach mózgu (kora przedczołowa, wzgórze, most, rdzeń kręgowy) u szczurów kontrolnych oraz z lezją.

MATERIAŁ I METODY

Zniszczenie ośrodkowego układu serotonergicznego wykonano u 3 dniowych noworodków szczurzych stosując dokomorowo 5.7-DHT w dawce 70 µg/10 µl w 0.1% roztworze kwasu askorbinowego. Właściwe testy behawioralne i biochemiczne wykonano po osiągnięciu przez zwierzęta 8 tygodnia życia.

WYNIKI

Wykazano, że chemiczna lezja ośrodkowego układu serotonergicznego tylko w niewielkim stopniu modyfikuje przeciwbólowe działanie nefopamu i indometacyny w modelu bólu zapalnego natomiast wyraźnie osłabia przeciwbólowe działanie morfiny i indometacyny w modelu bólu trzewnego u szczurów. W badaniach biochemicznych wykazano, że stosowane leki (za wyjątkiem indometacyny) zmieniają szybkość syntezy serotoniny (5-HT) oraz dopaminy (DA) w badanych strukturach mózgu. Powyższe wskazuje, że w ośrodkowych mechanizmach analgetycznego działania stosowanych leków poza układem serotonergicznym uczestniczą w różnym stopniu inne układy monoaminergiczne, tj. noradrenergiczny i dopaminergiczny.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki przemawiają za tym, że trwała dysfunkcja ośrodkowego układu serotonergicznego może prowadzić do zmienionej reakcji biologicznej na leki przeciwbólowe.

SŁOWA KLUCZOWE

lezja, ośrodkowy układ serotonergiczny, ból, morfina, nefopam, indometacyna, imipramina, szczury.

WSTĘP

Ból pełni w organizmie funkcję ostrzegawczo-obronną. Jego ostrzegawcze działanie pozwala na szybką reakcję na szkodliwy bodziec, np.

odsuwając rękę od gorącego przedmiotu unikamy uszkodzenia ciała. Od dawna znany jest fakt, że najważniejsze znaczenie w modulacji bodźców bólowych odgrywa endogeny układ opioidowy, na który składają się endorfiny oraz receptory opioidowe rozsiane

po całym ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym [1]. Warto zauważyć, że już w roku 1969 Reynolds wykazał, iż drażnienie prądem elektrycznym określonych struktur mózgowych wywoływało u doświadczalnych zwierząt analgezję [2]. Dalsze badania nad tym zagadnieniem doprowadziły do wyodrębnienia i opisanie struktur tworzących tzw. zstępujące drogi hamujące czucie bólu, które współdziałają z endogennym układem opioidowym w modulowaniu transmisji bodźców bólowych [3]. Warto wiedzieć, że w niektórych sytuacjach, np. stanach bardzo silnego wzburzenia emocjonalnego czy zagrożenia życia, zupełnie lub prawie zupełnie nie odczuwamy bólu. Zjawisko to jest niezmiernie ważne i posiada głęboki sens fizjologiczny, ponieważ zniesienie percepcji bólu w takich wypadkach istotnie zwiększa nasze szanse na przeżycie. Powyższy „mechanizm obronny” zawdzięczamy obecności wspomnianego uprzednio układu antynocyceptywnego [3]. Głównym ośrodkiem tego układu jest substancja szara okołowodociągowa (PAG), która daje kolaterale do jądra grzbietowo-przyśrodkowego i brzuszno-przyśrodkowego podwzgórza, jąder środkowej części wzgórza oraz tworzy siatkowatego. Jak wiemy neurony skupione w miejscu sinawym (LC) dają początek ośrodkowemu układowi noradrenergicznemu, natomiast z jąder szwu bierze swój początek układ serotonergiczny. Właśnie projekcje wychodzące z PAG do LC, jądra wielkiego szwu oraz jądra przyolbrzymiokomórkowego tworzą zstępujące drogi układu hamującego, tj. noradrenergiczną i serotonergiczną. Pobudzenie tych szlaków prowadzi do zahamowania aktywności neuronalnej drugich neuronów czucia bólu. W procesie tym dużą rolę przypisuje się zarówno receptorom serotoninowym 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃ oraz α_2 -adrenergicznym [4, 5, 6]. Współczesna farmakologia umożliwia oddziaływanie na wszystkie etapy, tj. przetwarzanie (transdukcja), modulację, przewodzenie i percepcję bodźców bólowych. Pierwszym jest zjawisko transdukcji czyli procesu, który dokonuje się w nocyceptorach stanowiących wolne zakończenia włókien nerwowych, zdolnych przekształcać energię mechaniczną, chemiczną lub termiczną w impulsację neuronalną (energię elektryczną). Leki wpływające na proces transdukcji to głównie niesteroidowe leki przeciwzapalne, opioidy oraz środki miejscowo znieczulające [7, 8]. Kolejnym punktem oddziaływania może być etap pole-

gający na przewodzeniu bodźców bólowych z tkanek do rdzenia kręgowego. W częściach ciała unerwianych przez nerwy rdzeniowe, wolne zakończenia nerwowe stanowią jednocześnie aksony pierwszego neuronu, zlokalizowanego w zwoju rdzeniowym. Wnikając do rdzenia kręgowego tworzą synapsę z drugim neuronem w rogu tylnym rdzenia kręgowego. Leki wpływające na ten etap przewodzenia bodźców to między innymi środki miejscowo znieczulające [7, 9]. Warto zaznaczyć, że następnym punktem uchwytu leków przeciwbólowych może być drugi neuron wstępujących dróg znajdujący się w rogu tylnym rdzenia kręgowego. Wykazano, że ten etap podlega działaniu takich leków jak opioidy, agoniści receptorów α_2 -adrenergicznych, trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne oraz selektywne inhibitory wychwyty serotoniny (5-hydroksytryptamina; 5-HT) i inne inhibitory wychwyty monoamin (np. nefopam) [7, 10]. Długie aksony drugiego neuronu krzyżują się w spoidle przednim tworząc drogę rdzeniowo-wzgórzową boczną. Droga ta kończy się we wzgórzu trzecim neuronem znajdującym się w jądrze brzuszno-tylno-bocznym wzgórza. Aksony trzeciego neuronu poprzez promienistość wzgórza docierają do korowych ośrodków czucia bólu w zakręcie zaśrodkowym. Ośrodki wyższe w mózgowiu odpowiadają za percepcję bólu oraz towarzyszącą jej komponentę emocjonalną, wszystko to jednak odbywa się za pośrednictwem trzeciego neuronu zlokalizowanego we wzgórzu. Leki hamujące ten etap to środki stosowane w anestezji jak antagoniści receptorów NMDA (np. ketamina), opioidy oraz agoniści receptorów α_2 -adrenergicznych [7].

Serotonina (5-hydroksytryptamina; 5-HT) bierze udział w regulacji wielu ważnych procesów w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) ssaków, które wpływają na łaknienie, zachowania emocjonalne, termoregulację, kontrolę ciśnienia tętniczego krwi, czynności akcji serca i oddychania oraz bólu [3, 11, 12, 13]. Prawidłowe działanie ośrodkowego układu serotonergicznego, które realizuje się poprzez zapewnienie sprawnej komunikacji między różnorodnymi obszarami i strukturami w mózgu ssaków jest możliwe jedynie w przypadku zachowania funkcjonalnej integralności tego układu. Natomiast jego uszkodzenie (np. chemiczna lezja) prowadzi do szeregu procesów reparacyjnych manifestujących się wyrównawczym nasileniem syntezy i uwalniania neuroprzekaźnika z ocalałych zakończeń nerwo-

wych, proliferacją zakończeń aksonalnych czy zmianą gęstości bądź reaktywności odpowiednich receptorów. Wykazano, że dokomorowe podanie 5.7-dihydroksytryptaminy (5.7-DHT) u szczurów prowadzi do *up-regulacji* receptorów 5-HT_{1A} oraz 5-HT_{1B} w hipokampie oraz jądrach grzbietowych szwu, pozostając bez wpływu na stan receptorów 5-HT₂. Jednocześnie stwierdzono, że zjawisku temu towarzyszy zwiększona reaktywność tychże receptorów (5-HT_{1A} oraz 5-HT_{1B}) w odpowiedzi na podanie specyficznych agonistów [14]. Uprzednio wykazano, że chemiczna lezja układu noradrenergicznego wywołana podaniem DSP-4 u noworodków szczurzych prowadzi do zmniejszenia reaktywności somatodendrytycznych autoreceptorów 5-HT_{1A} w jądrach szwu u dorosłych zwierząt, natomiast nie wywołuje zmian reaktywności receptorów 5-HT_{1A} zlokalizowanych postsynaptycznie [15]. Ferdyn-Drosik i wsp. [16] w tym samym modelu doświadczalnym opisali ponadto zjawisko desensytyzacji receptorów 5-HT_{1B}. Ponadto, DSP-4 stosowany u noworodków szczurzych wpływa na układ GABA-ergiczny osłabiając anksjolityczne właściwości diazepam u dorosłych zwierząt [17], zmieniając wrażliwość na drgawkotwórcze działanie bikukuliny i pentetrazolu oraz uspokajająco-nasenne właściwości fenobarbitalu i etanolu [18, 19] prowadząc jednocześnie do zmian neuroprzeżywalności GABA-ergicznego w korze przedczołowej [20]. W kolejnej serii badań prowadzonej w tutejszej Katedrze zaobserwowano, że przeciwbólowe działanie morfiny, paracetamolu i nefopamu ulega modyfikacji u zwierząt z lezją DSP-4 oraz, że w ośrodkowych mechanizmach analgetycznego działania badanych leków uczestniczą w różnym stopniu układy serotonergiczny i noradrenergiczny [21, 22]. W świetle przytoczonych faktów można przypuszczać, że trwałe zniszczenie ośrodkowego układu serotonergicznego wywołane podaniem 5.7-DHT u noworodków szczurzych może istotnie wpłynąć na działanie leków przeciwbólowych. Jak dotychczas znane są jedynie fragmentaryczne dane dotyczące zmiany działania opioidów (morfiny) w tym modelu badawczym. Brak jest natomiast usystematyzowanych danych jak chemiczna lezja tego układu wpłynie na odczuwanie bólu eksteroceptywnego wywołanego chemicznym oraz interoceptywnego (ból trzewny) po podaniu opioidu (morfiny) oraz innych analgetyków, w tym każdego o odmiennym mechanizmie działania, tj. nefopa-

mu, indometacyny oraz imipraminy. Powyższe może przyczynić się do lepszego zrozumienia patomechanizmów towarzyszących zjawisku odczuwania bólu w aspekcie interakcji pomiędzy systemami neuroprzeżywalnymi mózgu, a w konsekwencji doprowadzić do rozwoju nowych, skuteczniejszych strategii terapii bólu, jak również poszerzenia naszej wiedzy odnośnie mechanizmów działania różnorodnych leków przeciwbólowych. Należy bowiem pamiętać, że postęp jaki dokonuje się w tej dziedzinie jest możliwy między innymi dzięki szeroko zakrojonym badaniom neurobiologicznym wyjaśniającym molekularne mechanizmy zjawisk towarzyszących procesom transdukcji, transmisji i modulacji bodźców bólowych a jednocześnie szczegółowym badaniom różnorodnych związków chemicznych – potencjalnych leków, które mogą wpływać na te procesy. Wspólny wysiłek chemików, biologów i farmakologów sprawił, że współczesna medycyna dysponuje coraz szerszym arsenałem leków przeciwbólowych, często o odmiennych mechanizmach działania, niestety w niektórych sytuacjach klinicznych nadal osiągnięte efekty są dalekie od oczekiwań lekarzy i pacjentów.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na szczurzych noworodkach oraz dorosłych zwierzętach, samcach szczepu Wistar w wieku 8 - 10 tygodni o masie ciała ok. 250 g. Zwierzęta przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze ok. 22°C i 12-godzinnym sztucznym cyklu oświetleniowym dzień/noc: 12h/12h (światło od 7.00 do 19.00) ze swobodnym dostępem do wody i standardowej diety. Doświadczenia wykonano za zgodą i akceptacją Lokalnej Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego (zgoda nr 78/2007 z dnia 11.12.2007) i przeprowadzono zgodnie z zaleceniami NIH jak opisano w *Principles of Animals Laboratory Care*. Doświadczenia wykonano u nowo narodzonych szczurów samców szczepu Wistar. Noworodki szczurze podzielone zostały na 2 grupy, tj. kontrolną, która w 3 dniu życia otrzymała dezmetylimipraminę w dawce 20 mg/kg ip i po 30 minutach dokomorowo (icv) 10µl 0.1% roztworu kwasu askorbinowego oraz grupę z lezją, która również otrzymała

dezmetylimipraminę i po 30 minutach dokomorowo (icv) 5.7-DHT 70 µg/10 µl w 0.1% roztworze kwasu askorbinowego (po 35 µg/5 µl do każdej z komór). U dorosłych 8-tygodniowych zwierząt kontrolnych oraz szczurów z lezją 5.7-DHT wykonano testy behawioralne oraz badania biochemiczne. Doświadczenia wykonano po podaniu: soli fizjologicznej (1.0 ml/kg ip), morfiny (5.0 mg/kg sc), nefopamu (20 mg/kg ip), indometacyny (5.0 mg/kg ip) oraz imipraminy (10 mg/kg ip).

BADANIE PRZECIWBÓLOWEGO DZIAŁANIA W TEŚCIE WICIA [23]

Szczury na 24 godziny przed właściwym eksperymentem pozbawiono dostępu do pokarmu. W dniu badania zwierzęta umieszczano pojedynczo w wiwariach (o wymiarach 40 x 30 x 20 cm) i podawano iniekcję kwasu etakrynowego 3.0 mg/1ml/100 g masy ciała ip, który przyrządzano *ex tempore* (3/47 części wagowych etanol/woda). Po 10 minutach od podania kwasu etakrynowego rozpoczynano obserwację zliczając liczbę epizodów wicia. Zachowanie to polegało na przyjmowaniu charakterystycznej płaskiej postawy ciała z jednoczesną boczną rotacją kręgosłupa i wyciąganiem tylnych łap, tzw. zespół przeciągania się czyli wicia (w literaturze anglojęzycznej określany jako *writhing syndrome*). Epizody zliczano w przedziałach czasowych 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60 minut. Dla każdego przedziału czasowego wyliczano średnią dla grupy kontrolnej oraz z lezją układu serotonergicznego. Uzyskane wyniki (średnie) posłużyły następnie do obliczenia tzw. % zahamowania (wartość A we wzorze, patrz niżej). W drugim dniu badania 30 minut po podaniu kwasu etakrynowego u szczurów kontrolnych i z lezją ośrodkowego układu serotonergicznego stosowano morfinę (5.0 mg/kg sc) po czym po 10 minutach rozpoczynano obserwację jak opisano wyżej. Podobnie postępowano w kolejnych dniach po podaniu nefopamu (20 mg/kg ip), indometacyny (5.0 mg/kg ip) oraz imipraminy (10 mg/kg ip).

Do każdego eksperymentu używano osobnej grupy szczurów tzn. kwas etakrynowy stosowany był u każdego szczura tylko jeden raz. Procent zahamowania epizodów wicia wyliczono ze wzoru:

$$\% \text{ zahamowania} = 100 - \frac{100 \times B}{A}$$

gdzie symbol we wzorze A wyrażał średnią liczbę wic bez podania analgetyku wyliczoną dla odpowiedniego przedziału czasowego natomiast B – liczbę epizodów wic w odpowiednim przedziale czasowym po podaniu leku przeciwbólowego (osobno dla każdego szczura).

BADANIE PRZECIWBÓLOWEGO DZIAŁANIA W TEŚCIE FORMALINOWYM [24, 25]

W dniu eksperymentu szczury otrzymywały iniekcję 5% roztworu formaliny w objętości 50 µl w poduszeczkę prawej łapy. Następnie po 5 minutach od podania formaliny co 5 minut przez godzinę oceniano nasilenie reakcji bólowej posługując się odpowiednią skalą. Brak reakcji – zwierzę otrzymywało 0 pkt., gdy szczur stał na czterech łapach „oszczędzając” jednocześnie łapę, w którą otrzymał iniekcję formaliny poprzez przeniesienie ciężaru ciała na pozostałe kończyny otrzymywał 1 pkt., gdy unosił łapę ponad powierzchnię podłogi otrzymywał 2 pkt., gdy liżał łapę otrzymywał 3 pkt. 30 minut przed iniekcją 5 % roztworu formaliny szczurom podawano morfinę (5.0 mg/kg sc), nefopam (20 mg/kg ip), indometacynę (5.0 mg/kg ip) oraz imipraminę (10 mg/kg ip). Obserwację prowadzono do 60 min od podania formaliny. Do każdego eksperymentu używano osobnej grupy szczurów.

Oznaczenie zawartości 5-hydroksytryptofanu (5-HTP) oraz L-dihydroksy-feniloalaniny (L-DOPA) dokona metodą HPLC/ED.

Pomiar intensywności syntezy monoamin wykonano metodą pośrednią oznaczając chromatograficznie zawartości (szybkości kumulacji) 5-HTP oraz L-DOPA po podaniu inhibitora dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych NSD1015 100 mg/kg ip. [26]. W tym celu 30 minut po podaniu soli fizjologicznej, morfiny, nefopamu, indometacyny lub imipraminy zwierzęta obu badanych grup (kontrola i 5.7-DHT) otrzymały dodatkowo NSD1015. Następnie po 30 minutach szczury dekapitowano przy użyciu gilotyny po czym usuwano kości pokrywy czaszki i wyjmowano mózg, który umieszczano na płytce szklanej o temperaturze 0°C. Po wypreparowaniu kory przedczołowej, wzgórza, mostu i rdzenia kręgowego tkanki ważono i przechowywano w głębokim zamrożeniu (-70°C). W dniu oznaczenia badane tkanki homogenizowano w roztworze 0.1 M kwasu chlorowego (VII) (HClO₄ – Fluka) o temperaturze około 4°C z dodatkiem 0.05 mM kwasu askorbinowego (Supelco) a następnie odwirowywano po czym uzyskany superna-

tant bezpośrednio przed podaniem na kolumnę filtrowano przez strzykawkowe filtry celulozowe 0.2 μm . Właściwe oznaczenia wykonano posługując się zestawem do HPLC/ED (Gilson, France). Rejestracji danych dokonano za pośrednictwem przetwornika analogowo-cyfrowego UCI-100 połączonego z zestawem komputerowym do analizy chromatogramów i obróbki danych Chromeleon (Dionex, Germany). Skład fazy ruchowej: 75 mM diwodorofosforan (V) sodu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 1.7 mM kwas 1-oktanosulfonowy, 5 μM kwas etylenodiaminotetraoctowy, 100 μl trietyloaminy/11 fazy 9.5% acetonitryl. Do pH=3 doprowadzono roztwór przy użyciu kwasu fosforowego (V) (H_3PO_4). Oznaczenia chromatograficzne wykonano w temperaturze 22°C. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0.7 ml/min, do celi detektora elektrochemicznego przyłożony był potencjał utleniający +700 mV, czułość 10 nA/V, objętość pętli 20 μl . Zawartość 5-HTP oraz L-DOPA w badanych częściach mózgu wyliczano z pola powierzchni pików w oparciu o krzywą kalibracyjną oraz wagę próbek i przedstawiono w ng/g świeżej tkanki [27, 28].

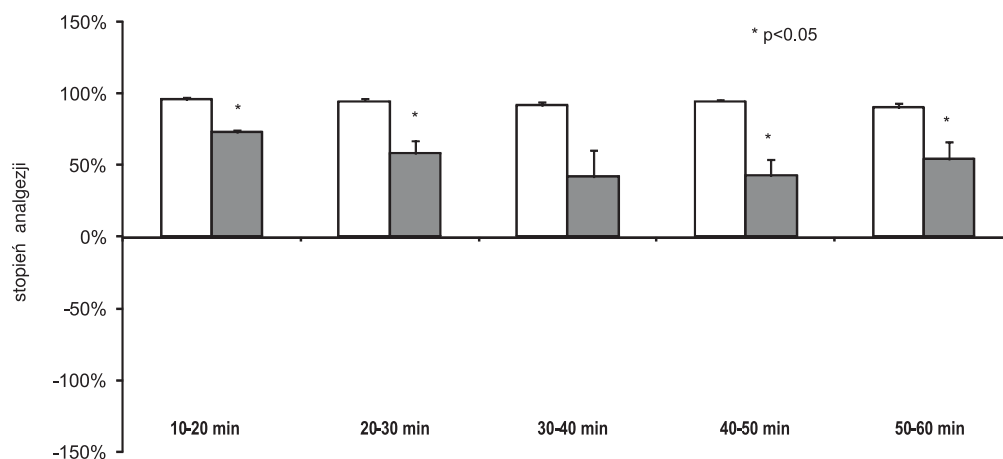
ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu t-Studenta lub analizy wariancji (ANOVA) i testu post-hoc Newmana-Keulsa. Za kryterium istotności przyjęto wartości p mniejsze od 0.05.

WYNIKI

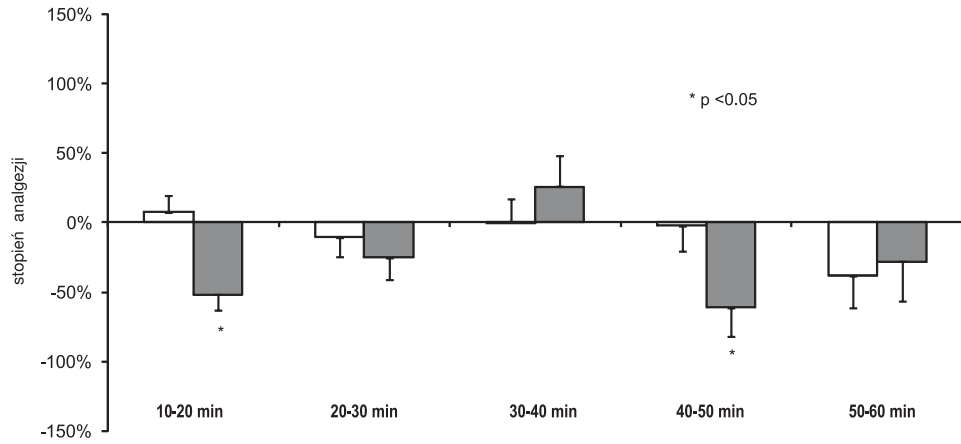
Przeciwbólowe działanie morfiny, nefopamu, indometacyny i imipraminy w teście wicia.

W teście wicia wykazano, że morfina (5.0 mg/kg sc) wywierała słabsze działanie przeciwbólowe u szczurów z leżą ośrodkowego układu serotonergicznego w porównaniu do kontroli. Uzyskane różnice były znamienne statystycznie w przedziałach 10-20, 20-30, 40-50 i 50-60 badania (Ryc. 1a). Nefopam w dawce 20 mg/kg ip nie wykazywał działania przeciwbólowego u szczurów kontrolnych a u zwierząt z leżą 5.7-DHT wywoływał hiperalgezę. Znamienność statystyczna wystąpiła w 10-20 oraz 40-50 przedziale badania (Ryc. 1b). Siła analgetycznego działania indometacyny w dawce 5.0 mg/kg ip była większa u szczurów kontrolnych w porównaniu z grupą 5.7-DHT a uzyskane różnice istotne w 10-20, 20-30, 40-50 przedziałach obserwacji (Ryc. 1c). Imipramina 10 mg/kg ip pozostawała bez wpływu na odczucie doznań bólowych w teście wicia u szczurów kontrolnych, natomiast u zwierząt z leżą ośrodkowego układu serotonergicznego wywoływała hiperalgezę. Uzyskane różnice były znamienne statystycznie w 10-20, 20-30, 30-40 przedziałach badania (Ryc. 1d).

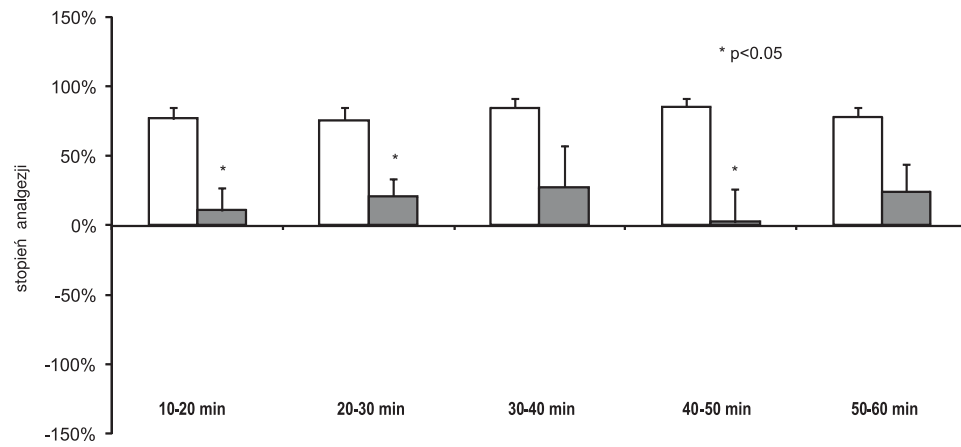


Rycina 1a

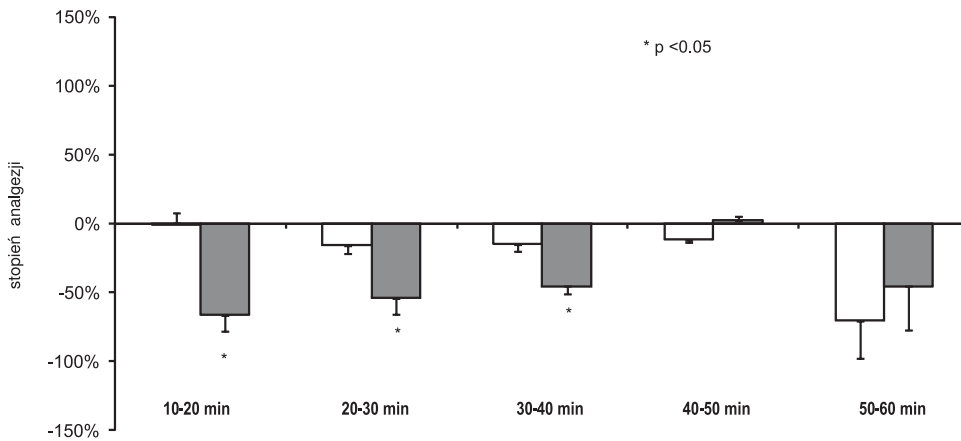
SKRÓCONY TYTUŁ: ANALGEZJA U SZCZURÓW Z LEZJĄ 5.7-DHT



Rycina 1b



Rycina 1c



Rycina 1d

Rycina 1. Wpływ lezji 5.7-DHT na przeciwbólowe efekty morfiny (5.0 mg/kg sc) (Ryc. 1a), nefopamu (20 mg/kg ip) (Ryc. 1b), indometacyny (5.0 mg/kg ip) (Ryc. 1c) oraz imipraminy (10 mg/kg ip) (Ryc. 1d) w teście wicia u szczurów (\pm SEM; n=10).

Figure 1. Effect of 5.7-DHT lesion on analgesia assessed in writhing test after morphine (5.0 mg/kg sc) (Fig. 1a), nefopam (20 mg/kg ip) (Fig. 1b), indomethacin (Ryc. 1c) and imipramine (10 mg/kg ip) (Fig. 1d) in adult rats (\pm SEM; n=10).

Objaśnienia (Explanations):

□ Kontrola (Control) ■ 5.7-DHT

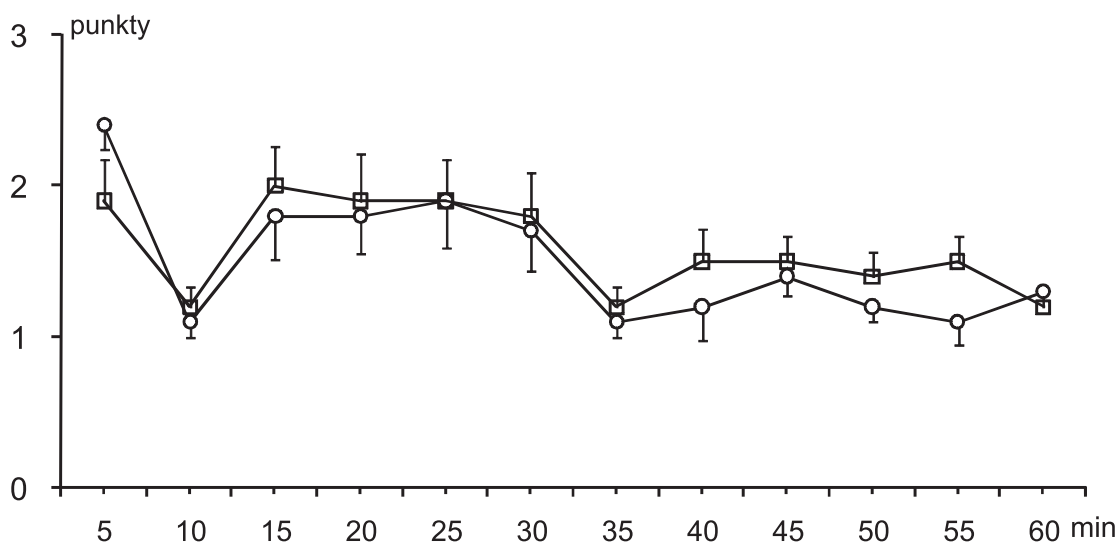
* p < 0.05 Kontrola (Control) vs. 5.7-DHT

PRZECIWBÓLOWE DZIAŁANIE MORFINY, NEFOPAMU, INDOMETACYNY I IMIPRAMINY W TEŚCIE FORMALINOWYM

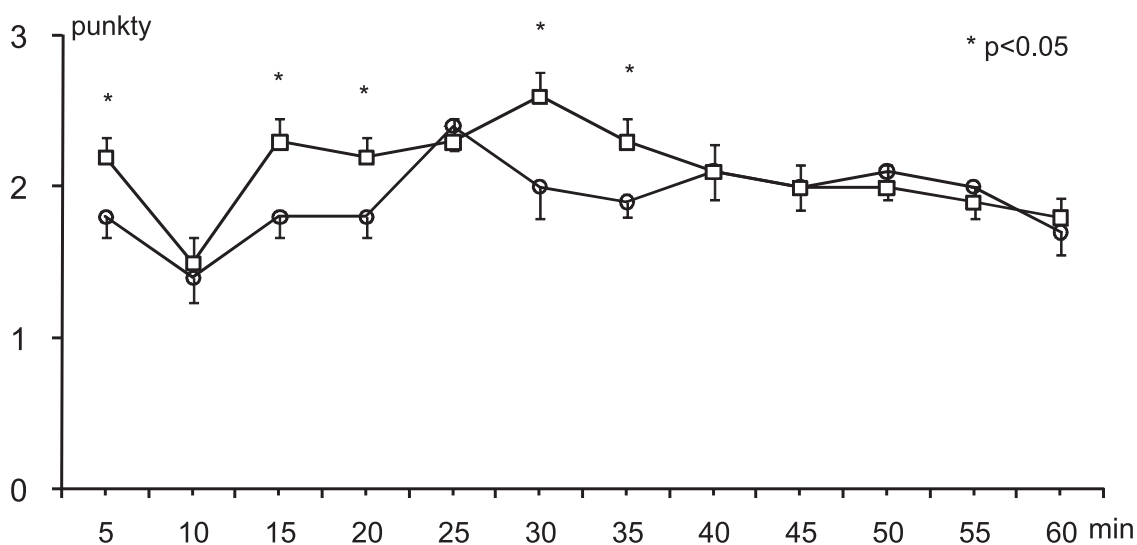
Nie stwierdzono różnicy w przeciwbólowym działaniu morfiny (5.0 mg/kg sc) oraz imipraminy (10 mg/kg ip) w teście formalinowym pomiędzy badanymi grupami zwierząt, tj. kontrolną oraz z leżą wywołaną podaniem 5.7-DHT (Ryc. 2a, 2d). Natomiast nefopam stosowany w dawce 20 mg/kg ip działał silniej przeciwbólowo u szczurów kontrolnych niż w grupie 5.7-DHT. Uzyskane różnice były istotnie statystycznie w 5, 15, 20, 30 i 35 minucie badania (Ryc. 2b). Indometacyna (5.0 mg/kg ip) wywierała słabsze działanie przeciwbólowe u szczurów kontrolnych, obserwowane różnice były znamienne jedynie w 15 i 20 minucie obserwacji (Ryc. 2c).

ZAWARTOŚĆ 5-HTP ORAZ L-DOPA W KORZE PRZEDCZOŁOWEJ, WZGÓRZU, MOŚCIE ORAZ RDZENIU KRĘGOWYM

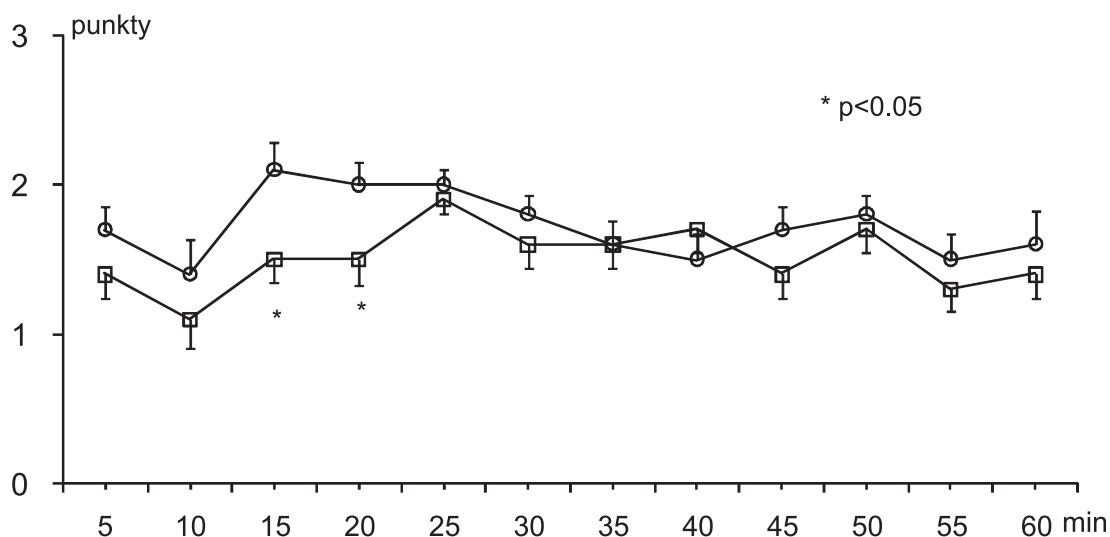
We wszystkich badanych strukturach mózgu, tj. korze przedczołowej, wzgórzu, moście i rdzeniu kręgowym (zarówno po podaniu 0.9% NaCl jak i morfiny, nefopamu, indometacyny lub imipraminy) wykazano znamienne spadki zawartości 5-HTP u szczurów z leżą układu serotonergicznego w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Morfina znamienne zwiększała zawartość 5-HTP w korze przedczołowej u szczurów kontrolnych natomiast nefopam i imipramina wywierały efekt odwrotny a indometacyna pozostawała bez wpływu (Ryc. 3a). Podobne wyniki uzyskano we wzgórzu oraz rdzeniu kręgowym (Ryc. 3b i 3d). W moście



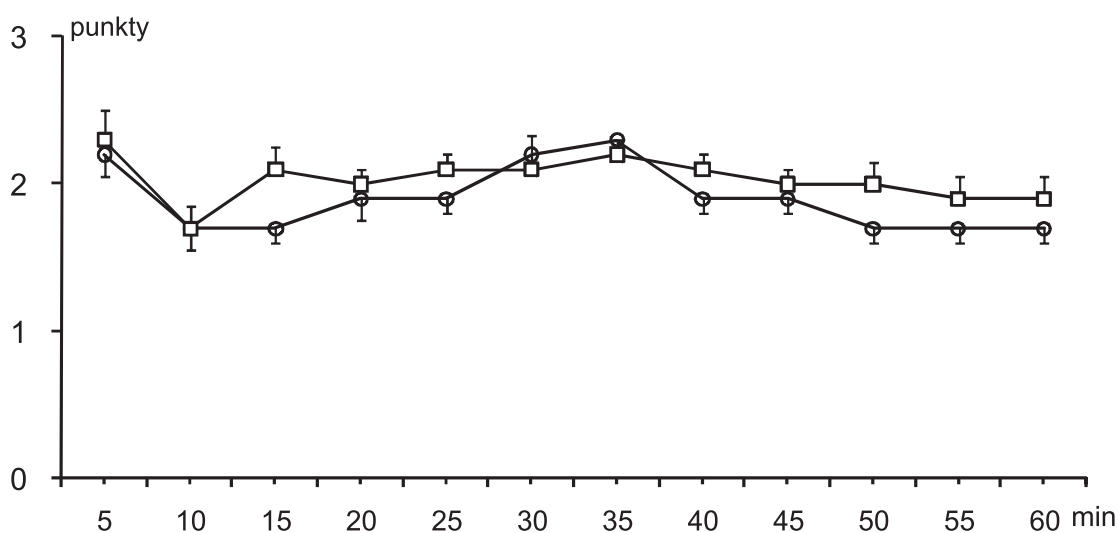
Rycina 2a



Rycina 2b



Rycina 2c



Rycina 2d

Rycina 2. Wpływ lezji 5.7-DHT na przeciwbólowe efekty morfiny (5.0 mg/kg sc) (Ryc. 2a), nefopamu (20 mg/kg ip) (Ryc. 2b), indometacyny (5.0 mg/kg ip) (Ryc. 2c) oraz imipraminy (10 mg/kg ip) (Ryc. 2d) w teście formalinowym u szczurów (\pm SEM; n=10).

Figure 2. Effect of 5.7-DHT lesion on analgesia assessed in formalin test after morphine (5.0 mg/kg sc) (Fig. 2a), nefopam (20 mg/kg ip) (Fig. 2b), indomethacin (Fig. 2c) and imipramine (10 mg/kg ip) (Fig. 2d) in adult rats (\pm SEM; n=10).

Objaśnienia (Explanations): --○-- Kontrola (Control) --□-- 5.7-DHT

* $p < 0.05$ Kontrola (Control) vs. 5.7-DHT

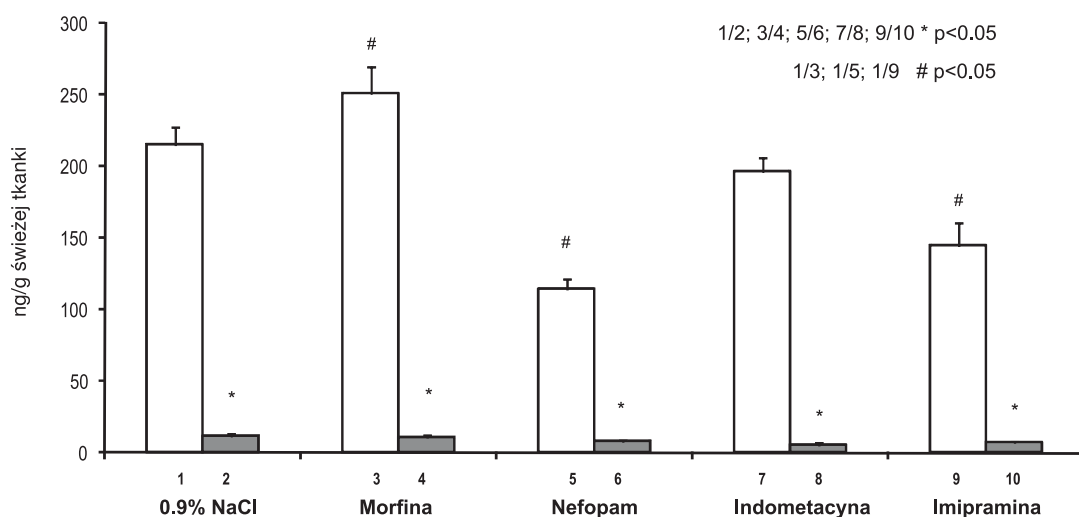
spadek zawartości 5-HTP obserwowano również po podaniu indometacyny (Ryc. 3c).

Nie stwierdzono istotnej różnicy w zawartości L-DOPA w korze przedczołowej pomiędzy szczurami kontrolnymi oraz z lezją 5.7-DHT zarówno po podaniu 0.9% roztworu NaCl jak i morfiny, nefopamu, indometacyny lub imipraminy. Morfina, nefopam oraz indometacyna nie zmieniały również zawartości L-DOPA

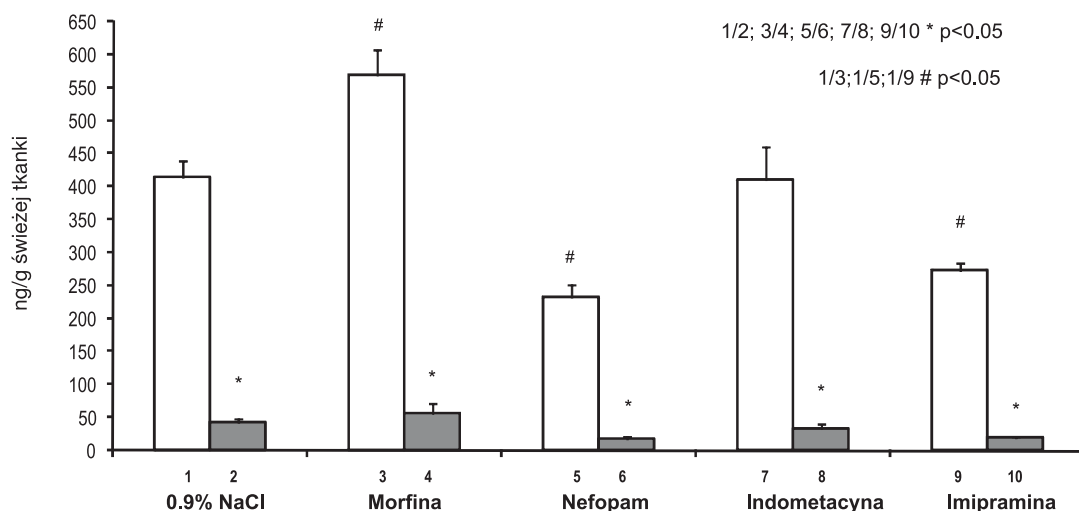
u szczurów kontrolnych w porównaniu do badania po podaniu soli fizjologicznej, jedynie imipramina wywoływała znamienne spadki L-DOPA u tych zwierząt. U szczurów z lezją 5.7-DHT zarówno nefopam jak i imipramina obniżały zawartość L-DOPA w porównaniu do badania po podaniu 0.9% NaCl, natomiast morfina i indometacyna pozostawały bez wpływu na badany parametr (Ryc. 4a). Po-

dobnie jak w przypadku kory przedczołowej, we wzgórzu również nie obserwowano różnic w zawartości L-DOPA pomiędzy kontrolą a grupą z leżą 5.7-DHT po podaniu 0.9% roztworu NaCl oraz morfiny, nefopamu, indometacyny lub imipraminy. Natomiast nefopam oraz imipramina znacząco zmniejszyły zawartość L-DOPA we wzgórzu zarówno u kontroli jak i u szczurów z leżą w porównaniu do badania po podaniu 0.9% NaCl. Morfina oraz indometacyna nie wpływały na badany parametr (w porównaniu do badania po podaniu soli fizjologicznej) (Ryc. 4b). Zawartość L-DOPA w móście nie różniła się pomiędzy badanymi grupami zwierząt, tj. kontrolą oraz 5.7-DHT po podaniu 0.9% NaCl, morfiny, nefopamu, indometacyny i imipraminy. Nefopam oraz imipramina znacząco obniżyły

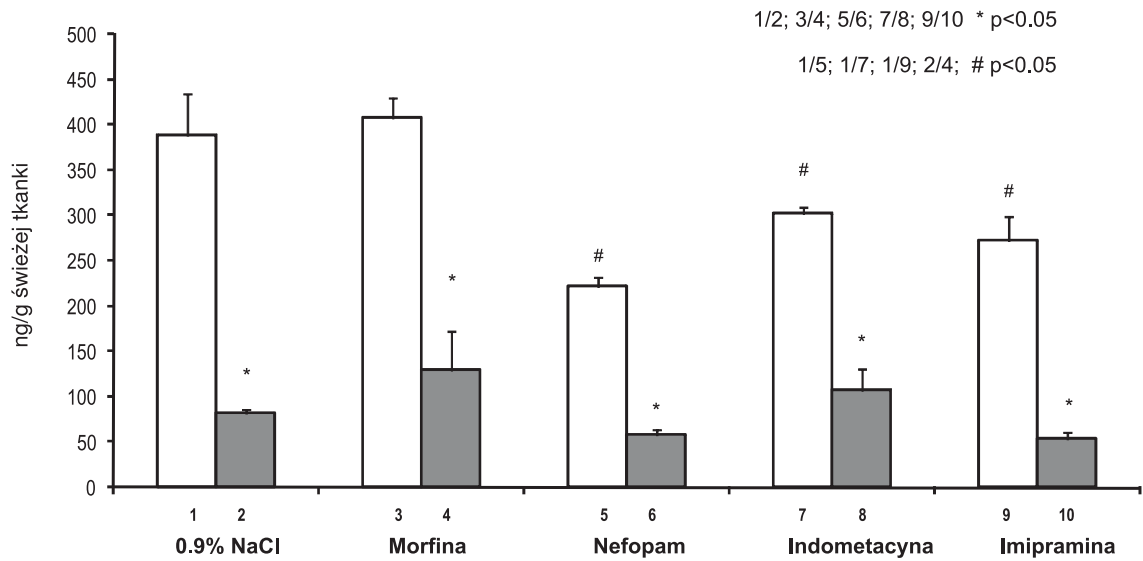
zawartość L-DOPA w obu badanych grupach w porównaniu do badania po podaniu soli fizjologicznej, efekt taki po zastosowaniu indometacyny obserwowano jedynie w grupie kontrolnej. Morfina nie wpływała na badany parametr (Ryc. 4c). Nie stwierdzono również istotnej różnicy w zawartości L-DOPA w rdzeniu kręgowym pomiędzy zwierzętami kontrolnymi oraz z leżą układu serotonergicznego po podaniu 0.9% roztworu NaCl. Również morfina oraz indometacyna nie wpływały na badany parametr w obu doświadczalnych grupach (w porównaniu do badania po podaniu soli fizjologicznej). Natomiast nefopam oraz imipramina znacząco obniżyły zawartość L-DOPA jedynie w grupie szczurów z leżą (w porównaniu do badania po podaniu soli fizjologicznej) (Ryc. 4d).



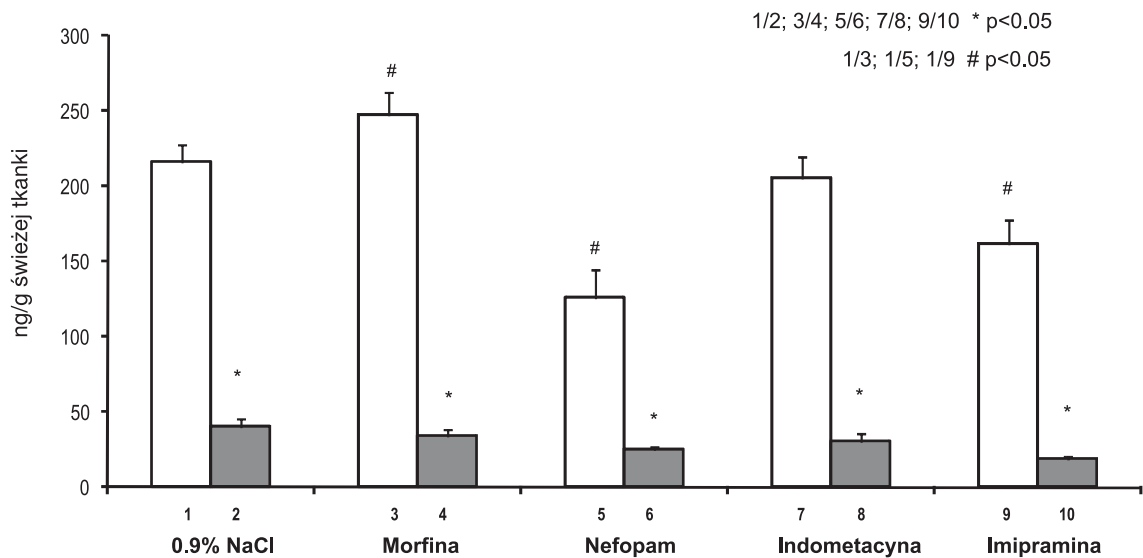
Rycina 3a



Rycina 3b



Rycina 3c



Rycina 3d

Rycina 3. Wpływ 5.7-DHT na zawartość 5-HTP w korze przedczołowej (Ryc. 3a), wzgórzu (Ryc. 3b), moście (Ryc. 3c) oraz rdzeniu kręgowym (Ryc. 3d) po podaniu morfiny (5.0 mg/kg sc), nefopamu (20 mg/kg ip), indometacyny (5.0 mg/kg ip) lub imipraminy (10 mg/kg ip) u szczurów (\pm SEM; n = 6).

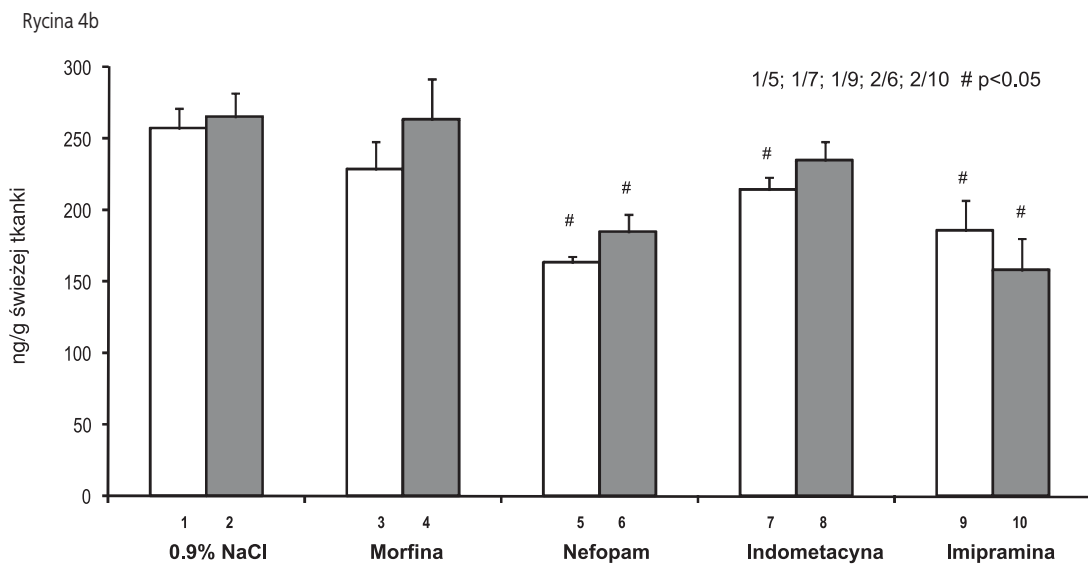
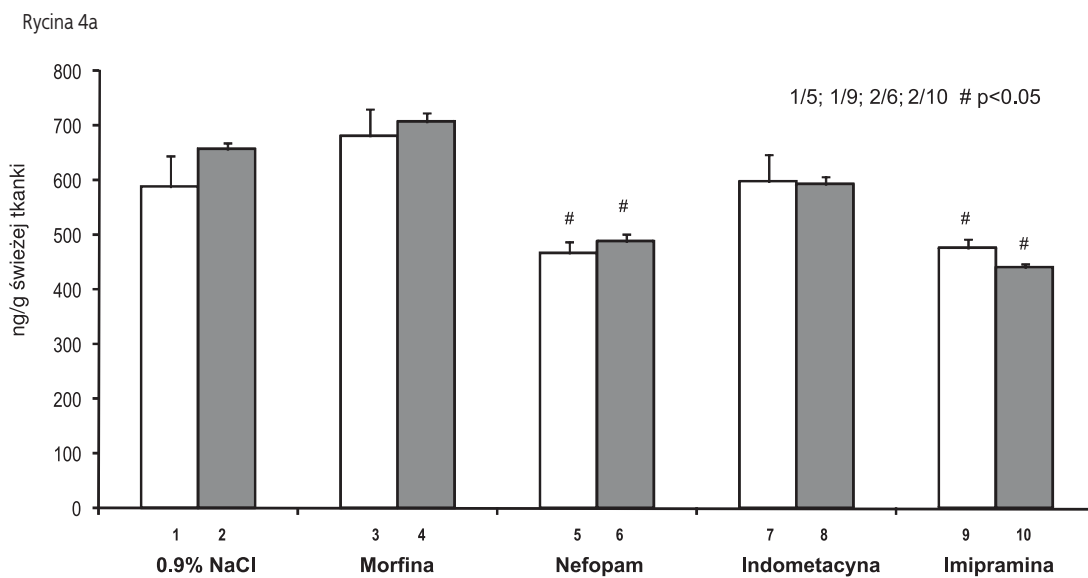
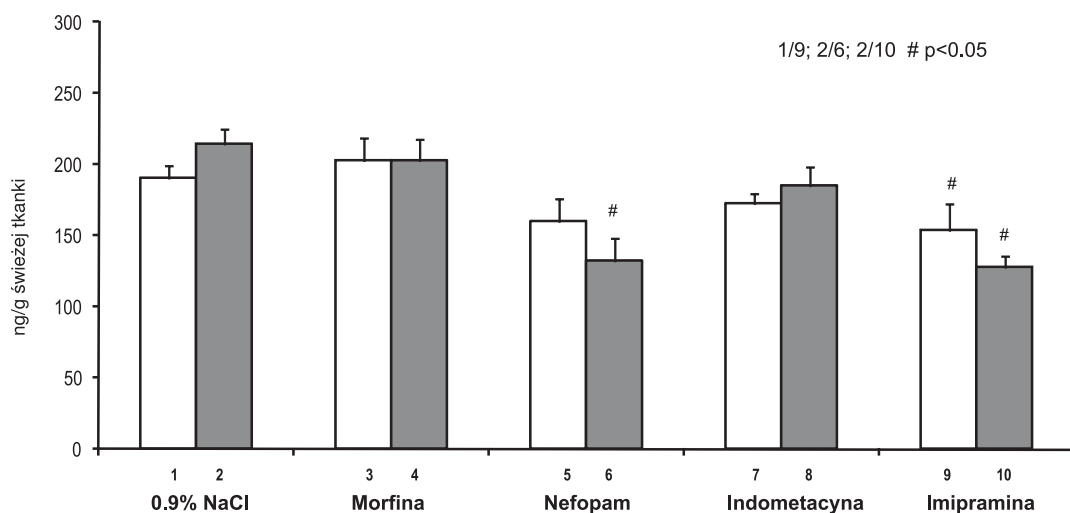
Figure 3. Effect of 5.7-DHT treatment on L-DOPA concentration in the prefrontal cortex (Fig. 3a), thalamus (Fig. 3b), pons (Fig. 3c) and spinal cord (Fig. 3d) after morphine (5.0 mg/kg sc), nefopam (20 mg/kg ip), indomethacin (5.0 mg/kg ip) and imipramine (10 mg/kg ip) administration in rats (\pm SEM; n = 6).

Objaśnienia (Explanations):

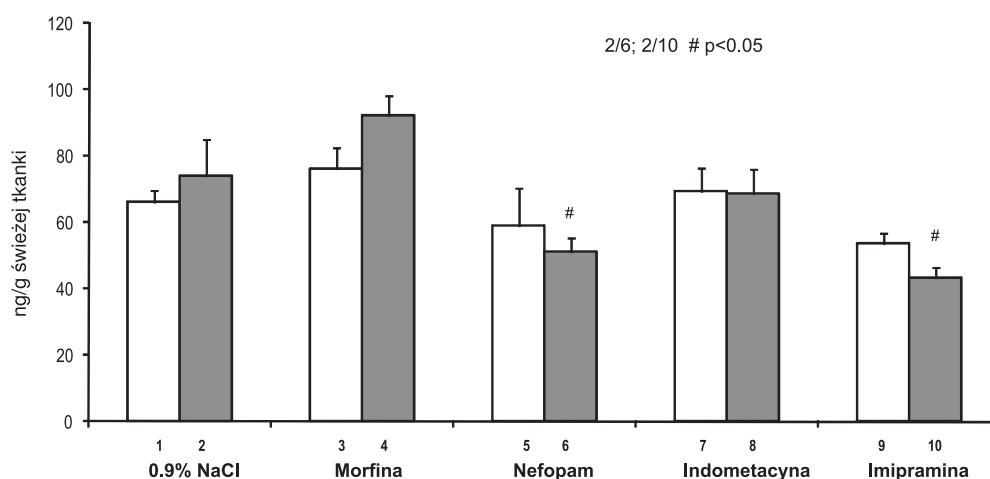
□ Kontrola (Control) ■ 5.7-DHT

* p < 0.05 Kontrola (Control) vs. 5.7-DHT

p < 0.05 Kontrola (Control) lub 5.7-DHT (po podaniu 0.9%NaCl) vs. Kontrola (Control) lub 5.7-DHT (po podaniu analgetyków)



Rycina 4c



Rycina 4d

Rycina 4. Wpływ 5.7-DHT na zawartość L-DOPA w korze przedczołowej (Ryc. 4a), wzgórzu (Ryc. 4b), moście (Ryc. 4c) oraz rdzeniu kręgowym (Ryc. 4d) po podaniu morfiny (5.0 mg/kg sc), nefopamu (20 mg/kg ip), indometacyny (5.0 mg/kg ip) lub imipraminy (10 mg/kg ip) u szczurów (\pm SEM; n = 6).

Figure 4. Effect of 5.7-DHT treatment on L-DOPA concentration in the prefrontal cortex (Fig. 4a), thalamus (Fig. 4b), pons (Fig. 4c) and spinal cord (Fig. 4d) after morphine (5.0 mg/kg sc), nefopam (20 mg/kg ip), indomethacin (5.0 mg/kg ip) and imipramine (10 mg/kg ip) administration in rats (\pm SEM; n = 6).

DYSKUSJA

Jak wspomniano we wstępie pracy spośród wielu różnorodnych substancji zaangażowanych w modulowanie percepcji doznań bólowych to endorfiny wydają się odgrywać kluczową rolę w tym procesie. Uwalnianie w różnych strukturach mózgu wywierają swoje biologiczne działanie poprzez receptory opioidowe znajdujące się w mózgu, rdzeniu kręgowym oraz w tkankach obwodowych. W niniejszej pracy wykazano, że morfina wykazuje podobne działanie przeciwbólne u zwierząt kontrolnych oraz z lezją 5.7-DHT w teście formalinowym (bodziec zapalny), co zgodne jest z obserwacjami innych autorów [29]. Również Nakazawa i wsp. [30] badając udział układów monoaminergicznym w przeciwbólowym działaniu morfiny oraz analogów dynorfiny stwierdzili, że lezja układu serotonergicznego (przy użyciu 5.7-DHT) nie wpływa na przeciwbólne efekty morfiny, natomiast zarówno para-chlorofenyloalanina (*p*-CPA; inhibitor syntezy 5-HT), DSP-4 czy 6-OHDA osłabiały działanie badanych związków. Inni wykazali natomiast, że wybiórcze zniszczenie układu serotonergicznego w rdzeniu kręgowym (doka-

nałowe podanie 5.7-DHT) osłabia analgetyczne efekty morfiny oceniane w testach z użyciem bodźca termicznego, natomiast pozostaje bez wpływu w przypadku bodźca mechanicznego [31]. Wyniki niniejszej pracy, jak i badania cytowanych autorów wskazują więc na wielokierunkową i bardzo złożoną rolę 5-HT w mechanizmach odczuwania bólu. W teście wicia oceniającym ból trzewny stwierdzono, że morfina wywiera silne i długotrwałe działanie przeciwbólne u szczurów kontrolnych, co znajduje potwierdzenie w piśmiennictwie [32, 33]. Jednocześnie wykazano, że w grupie 5.7-DHT analgetyczne działanie morfiny było znacznie osłabione w porównaniu do kontroli. Jak wcześniej wspomniano neurony 5-HT odgrywają znaczącą rolę w przeciwbólowych efektach opioidów, np. ostre podanie morfiny nasila uwalnianie 5-HT w wielu regionach mózgu oraz rdzeniu kręgowym [34, 35]. Ponadto przeciwbólne działanie morfiny może zostać zablokowane przez podanie spiperonu (antagonista receptora 5-HT_{1A} oraz 5-HT_{2A}), mianseryny (antagonista receptora 5-HT_{1C/2A}), alosetronu (antagonista receptora 5-HT₃) lub metysergidu (nieselektywny antagonist receptoru 5-HT_{2A}) [36, 37, 38]. Przytoczone dane literaturowe wskazują, że osłabienie neuro-

transmisji w układzie serotonergicznym poprzez blokady receptorowe hamuje analgezję wywołaną opioidami a jest oczywiste, że bardzo istotne upośledzenie procesu neurotransmisji dotyczy szczurów z leżą 5.7-DHT [39]. Zacytowane powyżej prace mogą pośrednio potwierdzać uzyskane w niniejszej pracy w teście wicia rezultaty, czyli osłabienie analgetycznego działania morfiny w grupie 5.7-DHT. Niestety w dostępnej literaturze nie doszukano się jednoznacznych danych jak zniszczenie układu serotonergicznego moduluje przeciwbólne efekty morfiny i innych analgetyków oceniane w modelach bólu trzewnego. Jedynie Korzeniewska-Rybicka i wsp. [41] wykazali, że „wyłączenie” układu serotonergicznego poprzez podanie *p*-CPA (inhibitor syntezy 5-HT) nie wpływa na odczucie bólu trzewnego (po dootrzewnowej iniekcji 2% roztworu kwasu octowego) w porównaniu do zwierząt kontrolnych (badanie wykonano bez podania jakiegokolwiek analgetyku). Ci sami autorzy wykazali natomiast, że 8-OH-DPAT - agonista receptora 5-HT_{1A} oraz klonidyna - agonista receptora α_2 -adrenergicznego znamienne hamowały liczbę więc wskazując tym samym na istotny wpływ układu serotonergicznego oraz adrenergicznego w odczuwaniu bólu trzewnego. Warto również dodać, że 5-HT jest bardzo ważnym neuroprzekaznikiem w autonomicznym układzie nerwowym a głównie w tzw. nerwowym układzie trzewnym (*enteric nervous system* – ENS). Wykazano, że 95% całej 5-HT znajdującej się w organizmie ssaków występuje w przewodzie pokarmowym, przede wszystkim w komórkach enterochromafinowych. Daje to w przybliżeniu wyobrażenie jak ważną rolę pełni ten neuroprzekaznik w perystaltyce i czynności wydzielniczej gruczołów przewodu pokarmowego oraz modulacji bodźców bólowych napływających z narządów jamy brzusznej [42, 43]. Wydaje się więc, że osłabienie przeciwbólowych efektów morfiny i indometacyny w teście wicia u zwierząt z leżą 5.7-DHT można tłumaczyć głęboką dysfunkcją układu serotonergicznego. Również Bjorkman [44] zaprezentował podobne wyniki stosując inny niesteroidowy lek przeciwzapalny i przeciwbólowy, tj. diklofenak. Cytowany autor wykazał, że lek ten działał znacznie słabiej przeciwbólowo w testach oceniających ból trzewny (test wicia oraz „*colorectal distension test*”) u szczurów z chemiczną leżą jąder szwu lub z zahamowaniem przekazywania serotoner-

gicznego wywołanym podaniem metiotepiny, ritanseryny czy *p*-CPA.

Upřednio wykazaliśmy, że 5.7-DHT stosowana dokomorowo u noworodków szczurzych wywołuje znamienne spadki zawartości 5-HT i 5-HIAA (w korze przedczołowej, wzgórzu i rdzeniu kręgowym) [45]. W niniejszej pracy stwierdzono ponadto istotne osłabienie intensywności syntezy 5-HT (mierzonej szybkością kumulacji 5-HTP) u szczurów z leżą 5.7-DHT we wszystkich badanych strukturach mózgu w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Efekt ten obserwowano zarówno po podaniu 0.9% NaCl, jak i morfiny, nefopamu, indometacyny lub imipraminy. Powyższe również znajduje potwierdzenie w literaturze [46]. Wykazano ponadto, że morfina znamienne zwiększała szybkość syntezy 5-HT w korze przedczołowej, we wzgórzu oraz rdzeniu kręgowym u szczurów kontrolnych pozostając bez wpływu na badany parametr w moście. Inni również zaobserwowali, że duże dawki morfiny (10 mg/kg) nasilają syntezę 5-HT w szeregu strukturach mózgu, mniejsze jedynie w niektórych [47]. Nie odnotowano natomiast zmian szybkości syntezy 5-HT u zwierząt z leżą 5.7-DHT (po podaniu morfiny). W dostępnej literaturze brak jest prac podejmujących podobny problem. Co ważne, pozostałe użyte w niniejszej pracy substancje narzędziowe, tj. nefopam, indometacyna oraz imipramina również nie zmieniały szybkości syntezy 5-HT u szczurów z leżą 5.7-DHT w porównaniu do odpowiedniej kontroli. Być może tak głębokie uszkodzenie (leżja) ośrodkowego układu serotonergicznego spowodowało upośledzenie zdolności do „biochemicznej reakcji” (w tym wypadku zmian szybkości syntezy 5-HT) na stosowane leki przeciwbólowe. Wykazano ponadto, że morfina nie wpływała na szybkość kumulacji L-DOPA i to zarówno u szczurów kontrolnych, jak i z leżą 5.7-DHT, co zgodne jest z doniesieniami innych autorów [48]. W tym miejscu warto dodać, że oznaczanie zawartości L-DOPA po podaniu inhibitora dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych (NSD1015) pozwala ocenić szybkość syntezy NA lub DA, interpretacja uzyskanych wyników zależy od badanej struktury mózgu. NSD 1015 blokuje przekształcenie L-DOPA do DA, jak wiadomo jest to wspólny szlak syntezy dla DA i NA. Tak więc w hipokampie, wzgórzu czy pniu mózgu zawartość L-DOPA odzwierciedla aktywność układu noradrenergicznego ponieważ jest to układ dominujący natomiast

w prążkowi czy jądrze połączone przegrody, gdzie zawartość DA jest około 100-krotnie większa od NA jest odwrotnie. W strukturach o zbliżonej zawartości NA i DA (kora czołowa) można mówić o wspólnym wskaźniku szybkości syntezy NA/DA.

Inną substancją narzędziową, którą posłużono się w badaniach był nefopam. W badaniach *in vitro* wykazano, że nefopam blokuje wychwyt zwrotny 5-HT oraz NA i w mniejszym stopniu DA w zstępujących drogach antynocyceptywnych oraz wpływa na receptory α_1 -, α_2 -adrenergiczne, dopaminergiczne D_2 oraz serotoninowe 5-HT_{1B} i 5-HT_{2C} [49, 50]. W dostępnej literaturze doszukano się tylko jednego doniesienia, w którym autorzy oceniali wpływ lezji układów monoaminergicznych wywołanych podaniem 5.7-DHT, 6-OHDA lub DSP-4 na przeciwbólowe działanie nefopamu [51]. Wykazali oni, że ani zniszczenie ośrodkowego układu serotonergicznego, ani noradrenergicznego nie wpływa na analgetyczne działanie badanego leku oceniane w teście gorącej płytki. Co ciekawe, Hunskaar i wsp. [52] stwierdzili, że farmakologiczne „wyłączenie” 5-HT wywołane podaniem *p*-CPA osłabia z kolei analgetyczne działanie nefopamu w teście formalinowym u myszy. Również w naszych badaniach wykazano, że nefopam w teście formalinowym działał silniej przeciwbólowo u szczurów kontrolnych niż w grupie 5.7-DHT. Girard i wsp. [50] również zaobserwowali, że nefopam (dawko-zależnie; 1.0 - 10 mg/kg) hamował obydwie fazy odczuwania bólu w teście formalinowym u myszy. Wykazali ponadto, że RS102221 (antagonista receptora 5-HT_{2C}) oraz sulpiryd (antagonista receptora D_2) osłabiali analgetyczne działanie tego leku w tym teście natomiast antagoniści receptorów D_1 , 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃ i 5-HT₄ pozostawali bez wpływu. Co ważne, ci sami autorzy wykazali jednocześnie, że lek ten działa analgetycznie w teście wicia. To ostatnie spostrzeżenie pozostaje niestety w sprzeczności z wynikami niniejszej pracy, ponieważ w teście wicia nefopam nie działał przeciwbólowo (w obu badanych grupach) a w dwóch okresach obserwacji, tj. 10-20 min oraz 40-50 min wywoływał u zwierząt z lezją 5.7-DHT zjawisko hiperalgezji. Rozbieżności pomiędzy badaniami cytowanych autorów a wynikami naszej pracy można ewentualnie tłumaczyć faktem, że wymienieni wykonywali doświadczenia na myszach a jako środka drażniącego wywołującego epizody wicia użyli kwasu octowego. W bada-

niach biochemicznych wykazano, że nefopam znacząco zmniejsza szybkość syntezy 5-HT we wszystkich badanych strukturach mózgu u szczurów kontrolnych pozostając bez wpływu na badany parametr u zwierząt z lezją 5.7-DHT. Również szybkość syntezy NA/DA mierzona kumulacją L-DOPA była obniżona po podaniu nefopamu we wszystkich strukturach u szczurów z lezją oraz we wzgórzu i moście u kontroli w porównaniu do odpowiednich grup po podaniu soli fizjologicznej. Warto dodać, że bardzo zbliżone efekty uzyskano stosując inną substancję narzędziową, a mianowicie imipraminę należącą do trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych. Jak wiemy, istnieją wspólne elementy w mechanizmach działania nefopamu i leków przeciwdepresyjnych (hamowanie wychwytu zwrotnego monoamin) [10], co mogłoby tłumaczyć podobieństwo w „profilu biochemicznym” tych leków. Uzyskane wyniki w większości są zgodne z danymi literaturowymi [53]. Substancje, które hamują wychwyt zwrotny amin zwiększają jednocześnie ich stężenie w szczelinie synaptycznej, co w konsekwencji prowadzi do pobudzenia autoreceptorów na zakończeniach aksonalnych oraz pośrednio (poprzez tzw. długą pętlę sprzężenia zwrotnego) receptorów zlokalizowanych na ciałach komórek nerwowych. Efektem tego jest zmniejszenie częstotliwości generowania impulsów elektrycznych oraz zahamowanie syntezy neuroprzekaźnika. Takie mechanizmy opisano dla imipraminy oraz innych substancji hamujących wychwyt zwrotny monoamin [54]. Leki przeciwdepresyjne zostały wprowadzone do terapii bólu w latach 80 ubiegłego wieku i są obecnie najczęściej stosowaną grupą leków w przewlekłych zespołach bólowych pochodzenia nienowotworowego. Mechanizm przeciwbólowego działania tych związków jest jednak nadal słabo poznany. Obok aktywizacji serotonergicznymi i noradrenergicznymi dróg zstępujących sugeruje się ich wpływ na kanały sodowe, receptory NMDA oraz receptory opioidowe [55]. W niniejszej pracy nie stwierdzono różnicy w przeciwbólowym działaniu imipraminy w teście formalinowym pomiędzy badanymi grupami zwierząt (kontrola vs. 5.7-DHT). Courteix i wsp. [56] zaobserwowali, że leki przeciwdepresyjne (amitryptylina i klomipramina) wywierają niewielki efekt analgetyczny w testach z zastosowaniem bodźca mechanicznego. W dostępnej literaturze nie doszukano się natomiast prac, które podejmowałyby problem wpływu lezji układu seroto-

ninergicznego i oceny działania przeciwbólowego imipraminy w teście formalinowym. Dostępne są jedynie doniesienia, które informują, że trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne, w tym imipramina wykazują działanie przeciwbólowe w testach oceniających ból zapalny [57, 58]. Na związek pomiędzy układem serotonergicznym a mechanizmem przeciwbólowego działania imipraminy wskazują doświadczenia Nayeby i wsp. [59], którzy posługując się testem formalinowym stwierdzili, że fluoksetyna wykazuje istotne działanie przeciwbólowe. Upřednie podanie 5.7-DHT znosiło ten efekt, natomiast łączne podanie fluoksetyny i morfiny wywoływało analgezję silniejszą niż w przypadku podania tych substancji każdej z osobna. W obecnych badaniach imipramina pozostawała również bez wpływu na odczucie doznań bólowych w teście wicia u szczurów kontrolnych, natomiast u zwierząt z leżą wywoływała hiperalgezję. Aoki i wsp. [60] wykazali, że imipramina, fluwoksamina oraz milnacipran są aktywne w teście wicia u myszy co niestety nie jest zgodne z wynikami naszej pracy. Sierralta i wsp. [61] stwierdzili, że łączne podanie *p*-CPA z alfa-metylo-*p*-tyrozyną (inhibitor syntezy NA i DA) osłabia analgetyczne działanie trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych w teście wicia u myszy. Niestety w naszych badaniach zastosowano prawdopodobnie dawkę imipraminy, która była zbyt mała aby wywołać efekt analgetyczny w teście wicia. Warto jednak dodać, że zbyt duże dawki leków przeciwdepresyjnych mogą wywołać inne efekty biologiczne (wpływ na koordynację ruchową, aktywność lokomotoryczną, itp.), które utrudniają następnie interpretację wyników w testach oceniających ból. Hiperalgezja, którą obserwowano u szczurów z leżą ośrodkowego układu serotonergicznego jest trudna do wytłumaczenia.

Celem oceny udziału ośrodkowego układu serotonergicznego w przeciwbólowych efektach niesteroidowych leków przeciwzapalnych i przeciwbólowych posłużono się pochodną kwasu indolooctowego – indometacyną. W teście formalinowym lek ten wywierał słabsze działanie przeciwbólowe u szczurów kontrolnych jedynie w 15 i 20 minucie obser-

wacji, natomiast w teście wicia siła analgetycznego działania indometacyny była większa u szczurów kontrolnych w porównaniu z grupą 5.7-DHT. W dostępnej literaturze brak jest prac podejmujących problem udziału układu serotonergicznego w mechanizmie działania indometacyny. Cytowany upřednio Bjorkman [44] wykazał, że inny niesteroidowy lek przeciwzapalny i przeciwbólowy (diklofenak) działał słabiej przeciwbólowo w testach oceniających ból trzewny (test wicia oraz „*colorectal distension test*”) pozostając bez wpływu w testach gorącej płytki lub imersji ogona u szczurów z chemiczną leżą jąder szwu. Pini i wsp. [62] dowiedli z kolei, że fenazon działał przeciwbólowo w teście gorącej płytki a farmakologiczne wyłączenie układu serotonergicznego (poprzez podanie *p*-CPA) hamowało ten efekt. Ci sami autorzy poczynili podobne obserwacje w odniesieniu do kwasu acetylosalicylowego [63]. Vitale i wsp. [64] wykazali również, że ośrodkowy układ serotonergiczny partycypuje w przeciwbólowym działaniu kwasu acetylosalicylowego (badania w teście formalinowym), nie wpływa jednak na zawartość 5-HT w mózgu ani gęstość receptorów 5-HT_{1A}. W badaniach biochemicznych wykazano, że indometacyna, poza jedynym wyjątkiem (most) nie wpływa na szybkość syntezy amin biogennych w badanych strukturach mózgu.

Na podstawie wykonanych badań wysunięto następujące wnioski:

1. Trwała dysfunkcja ośrodkowego układu serotonergicznego zaburza analgetyczne działanie morfiny, nefopamu i indometacyny u szczurów w modelach bólu trzewnego i w mniejszym stopniu zapalnego.
2. W ośrodkowych mechanizmach analgetycznego działania stosowanych leków uczestniczą również poza ośrodkowym układem serotonergicznym w różnym stopniu pozostałe układy monoaminergiczne, tj. noradrenergiczny i dopaminergiczny.
3. W stanach klinicznych w których dochodzi do upośledzenia funkcjonowania układu serotonergicznego można spodziewać się zmienionej reakcji biologicznej na leki przeciwbólowe.

PIŚMIENNICTWO:

1. Stein C, Clark J.D., Oh U, et al. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain Res. Rev.* 2009; 60: 90-113.

2. Reynolds D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 1969; 164: 444 - 445.

3. Yoshimura M., Furue H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic

- systems in the spinal cord. *J. Pharmacol. Sci.* 2006; 101: 107-117.
4. Mico J.A., Berrocoso E., Ortega-Alvaro A., Gibert-Rahola J., Rojas-Corrales M.O. The role of 5-HT_{1A} receptors in research strategy for extensive pain treatment. *Curr. Top. Med. Chem.* 2006; 6: 1997-2003.
 5. Rahman W., Suzuki R., Rygh L.J., et al. Descending serotonergic facilitation mediated through rat spinal 5HT₃ receptors is unaltered following carrageenan inflammation. *Neurosci. Lett.* 2004; 361: 229-231.
 6. Lu Y., Perl E.R. Selective action of nor-adrenaline and serotonin on neurones of the spinal superficial dorsal horn in the rat. *J. Physiol.* 2007; 582: 127-136.
 7. Sawynok J. Topical and peripherally acting analgesics. *Pharmacol. Rev.* 2003; 55: 1-20.
 8. Sawynok J. Topical analgesics in neuropathic pain. *Curr. Pharm. Des.* 2005; 11: 2995-3004.
 9. Ge Y.X., Xin W.J., Hu N.W., Zhang T., Xu J.T., Liu X.G. Clonidine depresses LTP of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn via NO-cGMP pathway. *Brain Res.* 2006; 1118: 58-65.
 10. Marazziti D., Rotondo A., Ambrogi F., Cassano G.B. Analgesia by nefopam: does it act through serotonin? *Drugs Exp. Clin. Res.* 1991; 17: 259-261.
 11. Mayers A.G., Baldwin D.S. Antidepressants and their effect on sleep. *Hum. Psychopharmacol.* 2005; 20: 533-559.
 12. Lesch K.P., Mössner R. Inactivation of 5HT transport in mice: modeling altered 5-HT homeostasis implicated in emotional dysfunction, affective disorders, and somatic syndromes. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2006; 175: 417-456.
 13. Gallup A.C., Gallup G.G. Yawning and thermoregulation. *Physiol. Behav.* 2008; 95: 10-16.
 14. Compan V., Segu L., Buhot M.C., Daszuta A. Selective increases in serotonin 5-HT_{1B/1D} and 5-HT_{2A/2C} binding sites in adult rat basal ganglia following lesions of serotonergic neurons. *Brain Res.* 1998; 793: 103-111.
 15. Dabrowska J., Nowak P., Brus R. Desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors induced by neonatal DSP-4 treatment. *Eur. Neuropharmacol.* 2007; 17: 129-137.
 16. Ferdyn-Drosik M., Jelito K., Korossy E., et al. Neonatal noradrenergic lesion affect central serotonergic system in adult rats. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2008; 17: 607-614.
 17. Bortel A., Świercz M., Jaksz M., et al. Anxiety-like behaviour in neonatally DSP-4 treated rats. Behavioural and biochemical studies. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2007; 61: 485-491.
 18. Bortel A., Nitka D., Słomian L., et al. Neonatal noradrenergic lesion with DSP-4 modifies the convulsant effect of bicuculline and pentylenetetrazole in adult rats. Behavioral and biochemical studies. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2008; 62: 46-52.
 19. Bortel A., Słomian L., Nitka D., et al. Neonatal N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) treatment modifies the vulnerability to phenobarbital- and ethanol-evoked sedative-hypnotic effects in adult rats. *Pharmacol. Rep.* 2008; 60: 331-338.
 20. Bortel A., Nowak P., Brus R. Neonatal DSP-4 treatment modifies GABAergic neurotransmission in the prefrontal cortex of adult rats. *Neurotox. Res.* 2008; 13: 247-252.
 21. Adamus-Sitkiewicz B., Körössy E., Bojanek K., et al. Impairment in pain perception in adult rats treated with N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) as neonates. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2009; 63: 67-74.
 22. Körössy E., Adamus-Sitkiewicz B., Nowak E., et al. Inflammatory and visceral pain perception in rats lesioned with DSP-4 as neonates. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2009; 63: 7-15.
 23. Poveda R., Planas E., Pol O., Romero A., Sánchez S., Puig M.M. Interaction between metamizol and tramadol in a model of acute visceral pain in rats. *Eur. J. Pain* 2003; 7: 439-448.
 24. Acton J., McKenna J.E., Melzack R. Amitriptyline produces analgesia in the formalin pain test. *Exp. Neurol.* 1992; 117: 94-96.
 25. León-Reyes M.R., Castañeda-Hernández G., Ortiz M.I. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of diclofenac in the presence and absence of glibenclamide in the rat. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2008; 11: 68-76.
 26. Carlsson A., Davis J.N., Kehr W., Lindqvist M., Atack C.V. Simultaneous measurement of tyrosine and tryptophan hydroxylase activities in brain in vivo using an inhibitor of the aromatic amino acid decarboxylase. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 1972; 275: 153-168.
 27. Nowak P., Bortel A., Dąbrowska J., et al. Histamine H₃ receptor ligands modulate L-dopa-evoked behavioral responses and L-dopa derived extracellular dopamine in dopamine-denervated rat striatum. *Neurotox. Res.* 2008; 13: 231-240.
 28. Nowak P., Jochem J., Żwirska-Korczała K., et al. Ontogenetic noradrenergic lesion alters histaminergic activity in adult rats. *Neurotox. Res.* 2008; 13: 79-83.
 29. Li J.Y., Wong C.H., Huang E.Y., et al. Modulations of spinal serotonin activity affect the development of morphine tolerance. *Anesth. Analg.* 2001; 92: 1563-1568.
 30. Nakazawa T., Yamanishi Y., Kaneko T. A comparative study of monoaminergic involvement in the antinociceptive action of E-2078, morphine and U-50,488E. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; 257: 748-753.
 31. Giordano J., Barr G.A. Effects of neonatal spinal cord serotonin depletion on opiate-induced analgesia in tests of thermal and mechanical pain. *Brain Res.* 1988; 469: 121-127.
 32. Jones C.K., Peters S.C., Shannon H.E. Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonergic and noradrenergic reuptake inhibitor, in inflammatory and acute pain models in rodents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005; 312: 726-732.
 33. Piston D., Wang S., Feng Y., et al. The role of cyclooxygenase-2/prostanoid pathway in visceral pain induced liver stress response in rats. *Chin. Med. J. (Engl.)* 2007; 120: 1813-1819.
 34. Grauer S.M., Tao R., Auerbach S.B. Morphine induces an increase in extracellular serotonin in the rat diencephalon. *Brain Res.* 1992; 599: 277-282.
 35. Tao R., Auerbach S.B. Increased extracellular serotonin in rat brain after systemic or intraperitoneal administration of morphine. *J. Neurochem.* 1994; 63: 517-524.
 36. Xu W., Cui X., Han J.S. Spinal serotonin 1A and 1C/2 receptors mediate supraspinal mu opioid-induced analgesia. *Neuroreport* 1994; 5: 2665-2668.
 37. Mori T., Kawano K., Shishikura T. 5-HT₃-receptor antagonist inhibits visceral pain differently in chemical and mechanical stimuli in rats. *J. Pharmacol. Sci.* 2004; 94: 73-76.
 38. Schulz R., Frenk H. The role of serotonin in analgesia elicited by morphine in the periaqueductal gray matter. *Brain Res.* 1991; 556: 353-357.
 39. Guiard B.P., El Mansari M., Merali Z., Blier P. Functional interactions between dopamine, serotonin and norepinephrine neurons: an in-vivo electrophysiological study in rats with monoaminergic lesions. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2008; 11: 625-639.
 40. Kurihara T., Nonaka T., Tanabe T. Acetic acid conditioning stimulus induces long-lasting antinociception of somatic inflammatory pain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003; 74: 841-849.
 41. Korzeniewska-Rybicka I., Płaźnik A. Role of serotonergic and noradrenergic systems in a model of visceral pain. *Pol. J. Pharmacol.* 2001; 53: 475-480.
 42. Baker D.E. Rationale for using serotonergic agents to treat irritable bowel syndrome. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 2005; 62: 700-713.
 43. Gershon M.D. Nerves, reflexes, and the enteric nervous system. *J. Clin. Gastroenterol.* 2005; 39: S184-193.
 44. Björkman R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. *Acta Anaesthesiol. Scand. Suppl.* 1995; 103: 1-44.
 45. Świercz M., Nowak P., Bałasz M., Walawander I., Ksaperski J., Skaba D., Nowak E., Szkilnik R.: Effect of neonatal serotonin depletion on morphine-, nefopam-, indomethacin-, and imipramine-induced analgesia in tests of thermal and mechanical pain in adult rats. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2010, 19, 33-41.
 46. Giambalvo C.T. Snodgrass S.R. Effect of p-chloroamphetamine and 5,7-dihydroxytryptamine on rotation and dopamine turnover. *Brain Res.* 1978; 149: 453-467.
 47. Johnston C.A., Moore K.E. The effect of morphine on 5-hydroxytryptamine synthesis and metabolism in the striatum, and several discrete hypothalamic regions of the rat brain. *J. Neural. Transm.* 1983; 57: 65-73.

48. Strömbom U, Svensson T.H. Antagonism of morphine-induced central stimulation in mice by small doses of catecholamine-receptor agonists. *J. Neural. Transm.* 1978; 42: 169-179.
49. Rosland J.H., Hole K. The effect of nefopam and its enantiomers on the uptake of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and dopamine in crude rat brain synaptosomal preparations. *J. Pharm. Pharmacol.* 1990; 42: 437-438.
50. Girard P., Coppé M.C., Verniers D., Pansart Y., Gillardin J.M. Role of catecholamines and serotonin receptor subtypes in nefopam-induced antinociception. *Pharmacol Res* 2006; 54:195-202.
51. Esposito E., Romandini S., Merlo-Pich E., Mennini T., Samanin R. Evidence of the involvement of dopamine in the analgesic effect of nefopam. *Eur. J. Pharmacol.* 1986; 128: 157-164.
52. Hunskaar S., Fasmer O.B., Broch O.J., Hole K. Involvement of central serotonergic pathways in nefopam-induced antinociception. *Eur. J. Pharmacol.* 1987; 138: 77-82.
53. Karolewicz B., Paul I.A., Antkiewicz-Michaluk L. Effect of NOS inhibitor on forced swim test and neurotransmitters turnover in the mouse brain. *Pol. J. Pharmacol.* 2001; 53: 587-596.
54. Fuller R.W., Snoddy H.D., Robertson D.W. Mechanisms of effects of d-fenfluramine on brain serotonin metabolism in rats: uptake inhibition versus release. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1988; 30: 715-721.
55. Coluzzi F., Mattia C. Mechanism-based treatment in chronic neuropathic pain: the role of antidepressants. *Curr. Pharm. Des.* 2005; 11: 2945-2960.
56. Courteix C., Bardin M., Chantelauze C., Lavarenne J., Eschalié A. Study of the sensitivity of the diabetes-induced pain model in rats to a range of analgesics. *Pain* 1994; 57: 153-160.
57. Zarrindast M.R., Baghdadi B., Sahebgharani M. Potentiation of imipramine-induced antinociception by nicotine in the formalin test. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2004; 14: 71-76.
58. Rojas-Corralles M.O., Casas J., Moreno-Brea M.R., Gibert-Rahola J., Micó J.A. Antinociceptive effects of tricyclic antidepressants and their noradrenergic metabolites. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2003; 13: 355-363.
59. Nayebi A.R., Hassanpour M., Reza-zadeh H. Effect of chronic and acute administration of fluoxetine and its additive effect with morphine on the behavioural response in the formalin test in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 2001; 53: 219-225.
60. Aoki M., Tsuji M., Takeda H., Harada Y., Nohara J., Matsumiya T., Chiba H. Antidepressants enhance the antinociceptive effects of carbamazepine in the acetic acid-induced writhing test in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2006; 550: 78-83.
61. Sierralta F., Pinardi G., Miranda H.F. Effect of p-chlorophenylalanine and alpha-methyltyrosine on the antinociceptive effect of antidepressant drugs. *Pharmacol. Toxicol.* 1995; 77: 276-280.
62. Pini L.A., Vitale G., Sandrini M. The role of serotonin brain receptors in the analgesic effect of phenazone. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1993; 19: 13-18.
63. Pini L.A., Sandrini M., Vitale G. Involvement of brain serotonergic system in the antinociceptive action of acetylsalicylic acid in the rat. *Inflamm. Res.* 1995; 44: 30-35.
64. Vitale G., Pini L.A., Ottani A., Sandrini M. Effect of acetylsalicylic acid on formalin test and on serotonin system in the rat brain. *Gen. Pharmacol.* 1998; 31: 753-758.