

Rola ośrodkowego układu serotonergicznego w mechanizmach przeciwbólowego działania morfiny u szczurów

Role of central serotonergic system in antinociceptive morphine mechanisms in rats

Rafał Muchacki¹, Ryszard Szkilnik², Anna Rogalska³, Łukasz S. Lewkowicz³, Przemysław Nowak³

STRESZCZENIE

WPROWADZENIE

Ośrodkowy układ serotonergiczny jest odpowiedzialny za regulację nastroju, procesów emocjonalnych, poznawczych, kontrolę apetytu, temperatury ciała oraz modulację doznań bólowych. W tym ostatnim przypadku jego rolę należy rozpatrywać w kontekście interakcji z układem opioidergicznym, na który składają się endogenne peptydy opioidowe, tj. endorfiny, enkefaliny i dynorfiny, wraz ze specyficznymi receptorami syntetyzowanymi w różnych częściach mózgu. Głównym celem pracy było zbadanie, jak zniszczenie ośrodkowego układu serotonergicznego we wczesnym okresie życia pozapłodowego u szczurów wpływa na przeciwbólowe działanie morfiny oceniane u dorosłych zwierząt.

METODY

Leżję ośrodkowego układu serotonergicznego wykonano u 3-dniowych noworodków szczurzych, stosując dokomorowo 5,7-dihydroksytryptaminę (5,7-DHT) w dawce 70 µg/10 µl. Właściwe testy behawioralne i biochemiczne wykonano po osiągnięciu przez zwierzęta 8–10 tygodnia życia. W ocenie działania przeciwbólowego morfiny (2,5 mg/kg) posłużono się testami gorącej płytki, immersji ogona, wycofania łapy, formalinowym oraz wicia. Ponadto zbadano wpływ leżji układu serotonergicznego na zawartość i metabolizm serotoniny w korze mózgowej czołowej.

WYNIKI

Stwierdzono, że leżja ośrodkowego układu serotonergicznego osłabia przeciwbólowe działanie morfiny w testach gorącej płytki, wicia oraz wycofania łapy, natomiast pozostaje bez wpływu w testach immersji ogona oraz formalinowym. Morfina nasilała metabolizm serotoniny w korze czołowej u szczurów kontrolnych oraz z leżją.

¹Beskidzkie Centrum Onkologii – Szpital Miejski im. Jana Pawła II w Bielsku-Białej

²Katedra i Zakład Podstawowych Nauk Medycznych oraz

³Zakład Toksykologii i Ochrony Zdrowia w Środowisku Pracy Katedry Toksykologii i Uzależnień Wydziału Zdrowia Publicznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

ADRES DO KORESPONDENCJI:

Prof. dr hab. n. med.
Przemysław Grzegorz Nowak
Zakład Toksykologii i Ochrony Zdrowia
w Środowisku Pracy
Katedry Toksykologii i Uzależnień
Wydziału Zdrowia Publicznego
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
ul. Medyków 18
40-752 Katowice
tel. +48 32 208 87 43
e-mail: pnowak@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2014, 68, 2, 109–116
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
eISSN 1734-025X
www.annales.sum.edu.pl

WNIOSEK

Dysfunkcja ośrodkowego układu serotonergicznego może prowadzić do zmienionej reakcji biologicznej na leki przeciwbólowe (morfinę).

SŁOWA KLUCZOWE

lezja, serotonina, opioidy, ból, morfina, szczury

ABSTRACT**BACKGROUND**

The central serotonergic system is involved in numerous functions in the human body including mood, emotional and cognitive processes, the control of appetite, temperature regulation and nociception. In the latter case, we have to consider the interaction between serotonin and the opioid system which consists of endogenic peptides, i.e. endorphins, enkephalin and dynorphins together with specific receptors synthesized in various brain parts. The main goal of the present work was to examine the effect of neonatal central serotonergic system lesions on the antinociceptive effect of morphine assessed in adult rats.

METHODS

On the 3rd day of postnatal life, male rats were administered 5.7-dihydroxytryptamine (5.7-DHT) (70 µg/10 µl). The rats continued to be housed until 8–10 weeks for further experimentation. The antinociceptive effects of morphine (2.5 mg/kg) were assessed by hot plate, tail immersion, paw withdrawal, formalin and writhing tests. Furthermore, the cerebral frontal cortex serotonin level and its metabolism was assayed.

RESULTS

It was demonstrated that the central serotonergic lesion attenuated antinociceptive effects evoked by morphine injection assessed in hot plate, writhing and paw withdrawal tests, whereas it has no effect in tail immersion and formalin tests. Morphine accelerated serotonin metabolism in the cerebral frontal cortex in the control and lesioned rats.

CONCLUSION

Dysfunction of the central serotonergic system may lead to a modified biological reaction to analgesic drugs (morphine).

KEY WORDS

lesion serotonin, opioids, pain, rats

WSTĘP

Ośrodkowy układ serotonergiczny jest odpowiedzialny za regulację nastroju, procesów emocjonalnych, poznawczych oraz modulację doznań bólowych [1,2,3]. W tym ostatnim przypadku jego rolę rozpatrywać należy w kontekście interakcji z układem opioidergicznym, na który składają się endogenne peptydy opioidowe, tj. endorfiny, enkefaliny i dynorfiny, wraz ze specyficznymi receptorami syntetyzowanymi w różnych częściach mózgu. Dotychczasowe obserwacje kliniczne i eksperymentalne przemawiają

za istotną rolę serotoniny (5-HT) w mechanizmach nocycepcji.

Warto zauważyć, że przeciwbólowe działanie trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, które hamują wychwyty zwrotny 5-HT i noradrenaliny (NA), zostało przekonująco udokumentowane licznymi wynikami badań klinicznych. Kontrolowane badania z użyciem placebo potwierdziły skuteczność tych leków (amitryptylina, imipramina, doksepina, klomipramina i inne) w terapii bólu neuropatycznego, napięciowego bólu głowy oraz migreny [4], dzięki czemu zostały one zaliczone do leków uzupełniających drabiny analgetycznej Światowej Organizacji Zdrowia.

Warto również zaznaczyć, że oprócz leków przeciwdepresyjnych, znane są inne związki, których mechanizm działania wiąże się z wpływem na układ serotonergiczny, np. nefopam, który w rdzeniu kręgowym blokuje wychwyt monoamin, tj. 5-HT i NA [5]. W praktyce klinicznej od dawna stosowane są również inne leki przeciwbólowe, których docelowym miejscem działania jest również układ serotonergiczny. W leczeniu migreny niezwykle cenne okazały się np. tryptany (jak sumatriptan, zolmitriptan, eletriptan), pochodne indolu, chemicznie zbliżone do 5-HT, które pobudzają receptor 5-HT_{1B/D} [6].

Najsilniej działającą przeciwbólowo grupą leków są opioidy, jednocześnie wiadomo, że związek między układem serotonergicznym a tymi substancjami nie jest do końca jasny. Badania eksperymentalne dostarczają w tym względzie sprzecznych danych. Zhao i wsp. [7] wykazali, że u myszy, które w wyniku manipulacji genetycznych pozbawione zostały czynnika transkrypcyjnego niezbędnego do rozwoju neuronów 5-HT i wykształcenia układu serotonergicznego, analgetyczne działanie agonistów receptorów μ , δ oraz κ było wybitnie osłabione. Wskazuje to, że 5-HT jest niezbędna dla analgezji wywołanej podaniem opioidów. Inni posługując się technikami elektrofizjologicznymi stwierdzili z kolei, że morfina nie zmienia czynności bioelektrycznej neuronów 5-HT w jądrach szwu, co – według autorów – wskazuje na brak zaangażowania 5-HT w analgetyczne działanie opioidów [8]. Przytoczone, sprzeczne ze sobą obserwacje wskazują na bardzo złożoną interakcję między układem serotonergicznym a opioidoergicznym i wymuszają konieczność dalszych badań dotyczących roli 5-HT w analgezji wywołanej podaniem narkotycznych leków przeciwbólowych.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na szczurzych noworodkach oraz dorosłych zwierzętach, samcach szczepu Wistar w wieku 8–10 tygodni. Zwierzęta przebywały w standardowych warunkach – w pomieszczeniach z naturalnym cyklem oświetlenia (sztuczne światło w godzinach 7.00–19.00), w temperaturze 22°C, ze swobodnym dostępem do paszy laboratoryjnej oraz wody. Na wykonanie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Badań na Zwierzętach Śląskiego Uniwersytetu Medycznego (zgoda nr 78/2007 z dnia 11.12.2007). Stosowano następujące substancje narzędziowe: 5,7-dihydroksytryptaminy chlorowodorek (5,7-DHT) (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA), morfiny chlorowodorek (Polf, Polska), dezmetylimipramina (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA).

W celu chemicznego zniszczenia ośrodkowego układu serotonergicznego 3-dniowe noworodki szczurze płci męskiej podzielono na 2 grupy:

- kontrolną – zwierzęta otrzymały dezmetylimipraminę w dawce 20 mg/kg IP i po 30 min dokomorowo (ICV) 10 μ l 0,1% roztworu kwasu askorbinowego (po 5 μ l do każdej z komór bocznych mózgu)
- z leżją 5,7-DHT – zwierzęta otrzymały dezmetylimipraminę w dawce 20 mg/kg IP i po 30 min ICV 5,7-DHT 70 μ g/10 μ l w 0,1% roztworze kwasu askorbinowego (po 35 μ g/5 μ l do każdej z komór bocznych mózgu).

Po osiągnięciu przez zwierzęta 8–10 tygodni życia przeprowadzono właściwe badania behawioralne i biochemiczne.

Badania behawioralne

1. Badanie przeciwbólowego działania morfiny w teście gorącej płytki [9]

Szczury umieszczano w centrum miedzianej płyty o wymiarach 40 cm x 30 cm x 0,42 cm, podgrzanej do temperatury 56°C („Gorąca płytka” Hp 41, COTM, Białystok), włączając równocześnie czasomierz (stoper). Zegar zatrzymano w momencie wystąpienia jednego z następujących zachowań: wstrząsanie lub lizanie łap, odrywanie ich od podłoża, podskakiwanie i piszczenie. Pozwoliło to określić czas latencji przed podaniem badanej substancji (T_0). Pomiary dokonywano po 10 min od dootrzewnowej iniekcji 0,9% NaCl 1,0 ml/kg IP u zwierząt obu badanych grup. Następnie wszystkim zwierzętom wstrzykiwano morfinę (2,5 mg/kg mc SC) i ponownie mierzono czas latencji po 30, 60, 90 i 120 min od momentu podania analgetyku. Procent analgezji wyliczano posługując się wzorem:

$$\% \text{ analgezji} = \frac{T_x - T_0}{T_{\max} - T_0} \times 100$$

gdzie: T_x – indywidualny czas latencji w odpowiednim przedziale czasowym po podaniu danej substancji; T_0 – indywidualny czas latencji przed podaniem badanej substancji; T_{\max} – 20 s.

2. Badanie przeciwbólowego działania morfiny w teście immersji ogona [10,11]

Szczury wszystkich badanych grup umieszczano pojedynczo w wykonanych z pleksiglasu klatkach o wymiarach zewnętrznych 22 x 7 x 7 cm. W tylnej części klatki znajdował się dodatkowy otwór, który umożliwiał zwierzęciu pozostawienie ogona na zewnątrz. Mierzono czas reakcji nocyceptywnej (tzw. czas latencji) po zanurzeniu przez szczura ogona w cylindrze

z wodą o temperaturze 58°. Reakcja ta polegała na gwałtownym ruchu ogona w odpowiedzi na zastosowany bodziec termiczny tzw. *tail-flick*. Następnie wstrzykiwano morfinę (2,5 mg/kg SC) i ponownie co 30 min oceniano czas reakcji. Jeżeli po 10 s. od zanurzenia ogona w cylindrze z wodą nie stwierdzono reakcji *tail-flick*, badanie przerywano, aby nie doszło do termicznego uszkodzenia tkanek. Stopień analgezji wyliczono według wzoru:

$$\% \text{ analgezji} = \frac{T_x - T_o}{T_{\max} - T_o} \times 100$$

gdzie: T_x – indywidualny czas latencji w odpowiednim przedziale czasowym po podaniu badanej substancji; T_o – indywidualny czas latencji przed podaniem badanej substancji; T_{\max} – 10 sekund

3. Badanie przeciwbólowego działania morfiny w teście wycofania łapy (test Randall-Selitto) [12,13]

Po 30 min od podania soli fizjologicznej (1,0 ml/kg IP) prawą tylną łapę szczura umieszczano na wykonanym z pleksiglasu cylindrycznym krążku o średnicy 1,0 cm. Następnie grzbietową powierzchnię łapy uciskano tępo zakończonym stożkiem połączonym z mechaniczną dźwignią, do której przyłożony był liniowo narastający nacisk mechaniczny. Obserwacji dokonywano odczytując wyrażoną w gramach siłę nacisku, przy której szczur wykazywał reakcje obronne (szarpnięcie łapy, pisk lub próba uwolnienia). Zakres siły nacisku wynosił 0–25 g. Badanie wykonywano 3-krotnie w odstępach 10-sekundowych, a z uzyskanych wyników wyliczano średnią. Następnie szczury otrzymywały morfinę w dawce 2,5 mg/kg SC i po 30 min od iniekcji były ponownie poddane opisanemu badaniu, które powtórzono jeszcze w 60, 90 i 120 min. Procent analgezji wyliczono według wzoru:

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

gdzie: A – nacisk wyrażony w gramach po podaniu soli fizjologicznej (średnia z trzech pomiarów); B – nacisk wyrażony w gramach mierzony w odpowiednich przedziałach czasowych.

4. Badanie przeciwbólowego działania morfiny w teście formalinowym [14,15]

Szczury otrzymywały iniekcję 5% roztworu formaliny w objętości 50 μ l w poduszeczkę prawej łapy. Następnie po 5 min oceniano co 5 min nasilenie reakcji bólowej według 3-punktowej skali: 0 – brak; 1 – zwierzę stoi na czterech łapach, lecz ciężar ciała przeniesiony ma na trzy łapy; 2 – łapa uniesiona jest ponad powierzchnię podścieliska; 3 – szczur liże łapę. Na 30 min przed iniekcją 5% roztworu formaliny szczurom podawano morfinę (2,5 mg/kg SC).

5. Badanie przeciwbólowego działania morfiny w teście wicia [16]

Szczury umieszczano pojedynczo w szklanych wiwariach o wymiarach 40 cm x 30 cm x 20 cm. Po 30 min adaptacji podawano 0,9% roztwór NaCl 1,0 ml/kg IP. Po kolejnych 30 min wstrzykiwano roztwór kwasu etakrynowego (3/47 części wagowych etanol/woda) w dawce 3,0 mg/1,0 ml/100 g IP, po czym po 10 min rozpoczynano obserwację, zliczając epizody wic, które polegały na przyjmowaniu charakterystycznej płaskiej postawy ciała, z jednoczesną boczną rotacją kręgosłupa, i wyciąganiu tylnych łap, tzw. zespół przeciągania się (*writing syndrome*). Epizody zliczano oddzielnie w przedziałach czasowych 10–20, 20–30, 30–40, 40–50, 50–60 min od dootrzewnowego wstrzyknięcia substancji drażniącej (kwasu etakrynowego); dla każdego przedziału czasowego wyliczano wartość średnią. Oddzielna grupa zwierząt otrzymywała iniekcję morfiny (2,5 mg/kg SC) i po 30 min kwas etakrynowy, następnie po 10 min rozpoczynano obserwacje jak wyżej.

Na podstawie uzyskanych danych wyliczono tzw. procent zahamowania epizodów wic posługując się wzorem:

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

gdzie: A – średnia liczba wic bez podania analgetyku wyliczona dla odpowiedniego przedziału czasowego; B – liczba epizodów wic w odpowiednim przedziale czasowym po podaniu analgetyku (osobno dla każdego szczura).

Badania biochemiczne

1. Oznaczenie zawartości 5-HT oraz 5-HIAA w korze mózgowej czołowej metodą chromatografii cieczowej wysokociśnieniowej z detekcją elektrochemiczną (HPLC/ED) [17]

Przed wykonaniem właściwego badania zwierzęta były przez 60 min adaptowane w pomieszczeniu, gdzie wykonywano doświadczenia, następnie 60 min po podaniu soli fizjologicznej (1,0 ml/kg IP) lub morfiny (2,5 mg/kg SC) dekapitowano je przy użyciu gilotyny, po czym usuwano kości pokrywy czaszki i wyjmowano mózg, który umieszczano na płytce szklanej o temperaturze 0°C. Po wypreparowaniu kory mózgowej czołowej tkanki zamrażano na zestalonym CO₂ (tzw. suchym lodzie), ważono i przechowywano w głębokim zamrożeniu (-70°C). W badanej strukturze oznaczono zawartość 5-HT oraz kwasu 5-hydroksyindoloctowego (5-HIAA) w tkankach, wyliczając z pola powierzchni pików na podstawie krzywej kalibracyjnej oraz masy badanych próbek. Wyniki przedstawiono w ng/g świeżej tkanki. Ponadto wyliczono tzw. współczynnik metaboliczny f , tzn. 5-HIAA/5-HT.

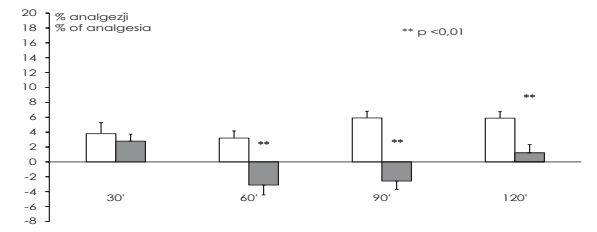
Analiza statystyczna

Analizę statystyczną, po zbadaniu normalności rozkładu otrzymanych wyników (test Kolmogorova-Smirnova), przeprowadzano przy użyciu testu t-Studenta. Za kryterium istotności przyjęto wartości p mniejsze od 0,01 lub 0,05. Wszystkie analizy wykonano za pomocą programu komputerowego STATISTICA 6.0 (StatSoft).

WYNIKI

Analgetyczne działanie morfiny w teście gorącej płytki

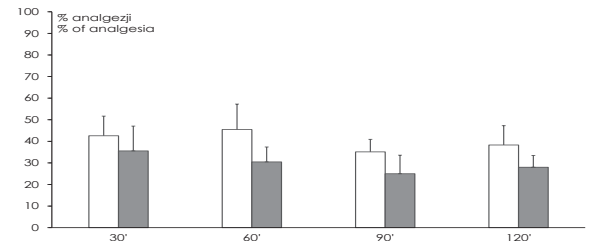
W teście gorącej płytki morfina (2,5 mg/kg SC) wykazała słabsze działanie analgetyczne u szczurów z chemiczną lezją ośrodkowego układu serotonergicznego niż w grupie kontrolnej. Uzyskane różnice były istotnie statystycznie w 60 (p < 0,01), 90 (p < 0,01) i 120 (p < 0,01) min testu (ryc. 1).



Ryc. 1. Wpływ lezji 5,7-DHT na analgetyczne działanie morfiny (2,5 mg/kg SC) w teście gorącej płytki u szczurów (± SEM; n = 8–10).
Objaśnienia: □ – Kontrola, ■ – Lezja 5,7-DHT.
Fig. 1. Effect of 5,7-DHT lesion on analgesia assessed in hot plate test after morphine injection (2.5 mg/kg SC) in rats (± SEM; n = 8–10).
Explanations: □ – Control, ■ – 5,7-DHT lesion
* p < 0,05; ** p < 0,01

Analgetyczne działanie morfiny w teście immersji ogona

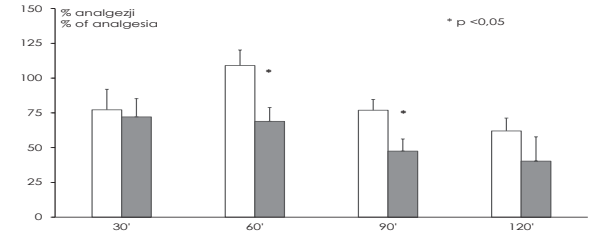
Nie stwierdzono różnic w analgetycznym działaniu morfiny (2,5 mg/kg SC) w teście immersji ogona między badanymi grupami, tj. kontrolą oraz szczurami z chemiczną lezją ośrodkowego układu serotonergicznego (ryc. 2).



Ryc. 2. Wpływ lezji 5,7-DHT na analgetyczne działanie morfiny (2,5 mg/kg SC) w teście immersji ogona u szczurów (± SEM; n = 8–10).
Objaśnienia jak w ryc. 1.
Fig. 2. Effect of 5,7-DHT lesion on analgesia assessed in tail immersion test after morphine injection (2.5 mg/kg SC) in rats (± SEM; n = 8–10).
Explanations as in Fig. 1.

Analgetyczne działanie morfiny w teście wycofania łapy

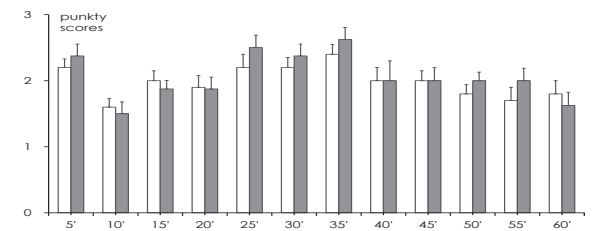
W teście wycofania łapy morfina (2,5 mg/kg SC) wykazywała słabsze działanie analgetyczne u szczurów z chemiczną lezją ośrodkowego układu serotonergicznego niż w grupie kontrolnej. Uzyskane różnice były istotnie statystycznie jedynie w 60 (p < 0,05) i 90 (p < 0,01) min obserwacji (ryc. 3).



Ryc. 3. Wpływ lezji 5,7-DHT na analgetyczne działanie morfiny (2,5 mg/kg SC) w teście wycofania łapy u szczurów (± SEM; n = 8–10).
Objaśnienia jak w ryc. 1.
Fig. 3. Effect of 5,7-DHT lesion on analgesia assessed in paw withdrawal test after morphine injection (2.5 mg/kg SC) in rats (± SEM; n = 8–10).
Explanations as in Fig. 1.

Analgetyczne działanie morfiny w teście formalinowym

W teście formalinowym wykazano, że po podaniu morfiny (2,5 mg/kg SC) natężenie odczuwania bólu oceniane 4-stopniową skalą punktową było zbliżone w obu grupach badawczych (ryc. 4).



Ryc. 4. Wpływ lezji 5,7-DHT na analgetyczne działanie morfiny (2,5 mg/kg SC) w teście formalinowym u szczurów (± SEM; n = 8–10).
Objaśnienia jak w ryc. 1.
Fig. 4. Effect of 5,7-DHT lesion on analgesia assessed in formalin test after morphine injection (2.5 mg/kg SC) in rats (± SEM; n = 8–10).
Explanations as in Fig. 1.

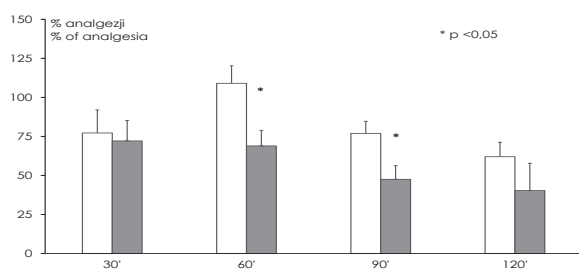
Należy nadmienić, że rezultaty uzyskane w 5 min testu świadczą o wpływie analgetyku na ostry ból nocyceptywny wywołany iniekcją czynnika drażniącego (formaliny).

W 10 min testu intensywność doznań bólowych w obu grupach badawczych zmniejszyła się, po czym stopniowo w kolejnych przedziałach czasowych narastała, maksymalny efekt wystąpił w 25–30 min obserwacji. Należy dodać, że począwszy od 15 min testu uzyskane wyniki świadczą o wpływie stosowanych

analgetyków na ból wywołany rozwijającym się stanem zapalnym.

Analgetyczne działanie morfiny w teście wicia

W teście wicia stwierdzono, że analgetyczne działanie morfiny (2,5 mg/kg SC) było słabiej wyrażone u szczurów z lezją ośrodkowego układu serotoniner-gicznego niż u zwierząt kontrolnych. Uzyskane różnice były znamienne statystycznie w następujących przedziałach czasowych badania: 10–20, 20–30 oraz 30–40 ($p < 0,05$; ryc. 5).

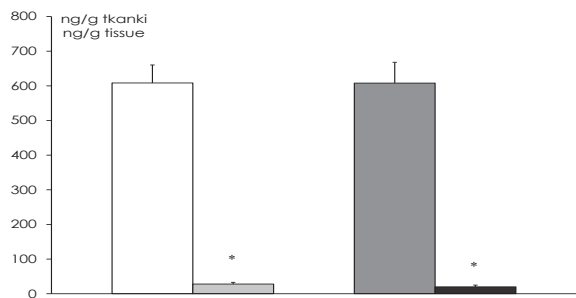


Ryc. 5. Wpływ lezji 5,7-DHT na analgetyczne działanie morfiny (2,5 mg/kg SC) w teście wicia u szczurów (\pm SEM; $n = 8-10$) Objaśnienia jak w ryc. 1.

Fig. 5. Effect of 5,7-DHT lesion on analgesia assessed in writhing test after morphine injection (2,5 mg/kg SC) in rats (\pm SEM; $n = 8-10$). Explanations as in Fig. 1.

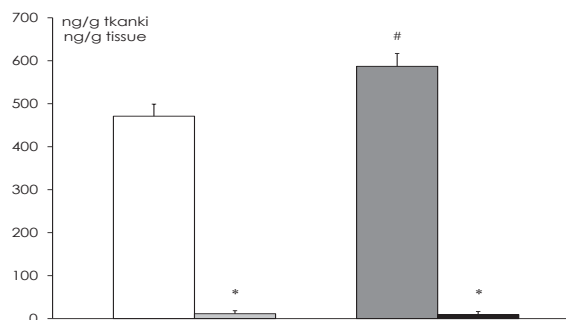
Zawartość 5-HT i 5-HIAA

Wykazano, że podanie 5,7-DHT wywołuje znaczny – w porównaniu z grupą kontrolną – spadek zawartości 5-HT oraz jej metabolitu 5-HIAA w korze mózgowej czołowej szczurów z lezją (uzyskane różnice były statystycznie znamienne; $p < 0,01$; ryc. 6 i 7).



Ryc. 6. Wpływ lezji 5,7-DHT na zawartość 5-HT po podaniu morfiny (2,5 mg/kg SC) w korze mózgowej czołowej u szczurów (\pm SEM; $n = 7-8$). Objaśnienia: □ – Kontrola (0,9% NaCl), □ – Lezja 5,7-DHT (0,9% NaCl), ■ – Kontrola (morfina), ■ – Lezja 5,7-DHT (morfina). * $p < 0,01$ kontrola/lezja 5,7-DHT (0,9% NaCl); # $p < 0,01$ kontrola/lezja 5,7-DHT (morfina).

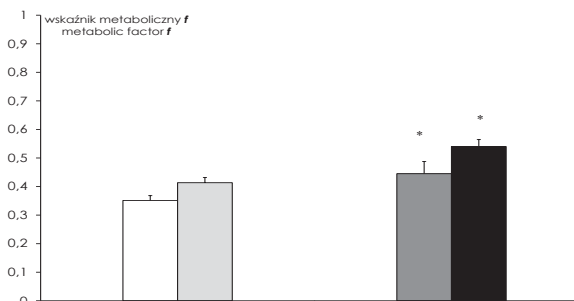
Fig. 6. Effect of 5,7-DHT lesion on 5-HT concentration in cerebral frontal cortex after morphine injection (2,5 mg/kg SC) in rats (\pm SEM; $n = 7-8$). Explanations: □ – Control (0,9% NaCl), □ – 5,7-DHT lesion (0,9% NaCl), ■ – Control (morphine), ■ – 5,7-DHT lesion (morphine), * $p < 0,01$ control/lesion 5,7-DHT (0,9% NaCl); # $p < 0,01$ control/lesion 5,7-DHT (morphine).



Ryc. 7. Wpływ lezji 5,7-DHT na zawartość 5-HIAA po podaniu morfiny (2,5 mg/kg SC) w korze mózgowej czołowej u szczurów (\pm SEM; $n = 7-8$). Objaśnienia jak w ryc. 6.

Fig. 7. Effect of 5,7-DHT lesion on 5-HIAA concentration in cerebral frontal cortex after morphine injection (2,5 mg/kg SC) in rats (\pm SEM; $n = 7-8$). Explanations as in Fig. 6.

Jednocześnie stwierdzono, że morfina (2,5 mg/kg SC) pozostaje bez wpływu na zawartość 5-HT zarówno u szczurów z lezją, jak i u kontrolnych w porównaniu z badaniem po podaniu 0,9% roztworu NaCl. Zawartość 5-HIAA była istotnie podwyższona w grupie kontrolnej po podaniu morfiny (2,5 mg/kg SC) w porównaniu z wynikami po podaniu soli fizjologicznej. Wartość wskaźnika metabolicznego f (5-HIAA/5-HT) była istotnie podwyższona u szczurów kontrolnych i z lezją po podaniu morfiny (2,5 mg/kg SC) w porównaniu z wynikami badania po podaniu soli fizjologicznej (ryc. 8).



Ryc. 8. Wpływ lezji 5,7-DHT na wskaźnik metaboliczny f po podaniu morfiny (2,5 mg/kg SC) w korze mózgowej czołowej u szczurów (\pm SEM; $n = 7-8$). Objaśnienia jak w ryc. 6.

Fig. 8. Effect of 5,7-DHT lesion on metabolic factor f in cerebral frontal cortex after morphine injection (2,5 mg/kg SC) in rats (\pm SEM; $n = 7-8$). Explanations as in Fig. 6.

DYSKUSJA

Jak wspomniano we wstępie pracy, ośrodkowy układ serotoniner-giczny jest zaangażowany w percepcję doznań bólowych, jednak jego rola w mechanizmie działania opioidów nie została w pełni wyjaśniona. W niniejszej pracy wykazano, że morfina – czysty agonista receptorów opioidowych μ , stosowany

w dawce 2,5 mg/kg s.c. – działa słabiej przeciwbólowo w testach gorącej płytki, wycofania łapy oraz wicia u szczurów z leżą ośrodkowego układu serotonergicznego niż u szczurów kontrolnych, natomiast w badaniach oceniających nasilenie bólu zapalnego (test formalinowy) oraz immersji ogona nie obserwowano różnic między badanymi grupami.

Wyniki uzyskane w teście immersji ogona są zgodne z obserwacjami innych autorów. Li i wsp. [18] wykazali, że dokanałowe (intratekalne) podanie 5,7-DHT (10 µg) opóźnia wystąpienie tolerancji na analgetyczne działanie morfiny (5,0 mg/kg IP) po długotrwałym jej stosowaniu u szczurów, ale nie wpływa na przeciwbólowe działanie tego leku, oceniane w teście immersji ogona, po jednorazowym ostrym podaniu. Również Nakazawa i wsp. [19], badając udział układów monoaminergicznym w przeciwbólowym działaniu morfiny oraz analogów dynorfiny, wykazali, że chemiczna lezja układu serotonergicznego nie wpływa na analgetyczne efekty morfiny badane w teście immersji ogona. Ci sami autorzy zauważyli, że zarówno p-CPA (inhibitor syntezy 5-HT), DSP-4 (neurotoksyna układu noradrenergicznego), jak i 6-OHDA (neurotoksyna układu dopaminowego) osłabiały przeciwbólowe działanie badanych związków. Inni stwierdzili natomiast, że wybiórcze zniszczenie układu serotonergicznego w rdzeniu kręgowym (dokanałowe podanie 5,7-DHT) osłabia analgetyczne efekty morfiny oceniane w testach z użyciem bodźca termicznego, natomiast pozostaje bez istotnego wpływu w przypadku bodźca mechanicznego [20], co nie jest, niestety, zgodne z wynikami niniejszej pracy oraz z nowszymi badaniami Rahman i wsp. [21].

Zastanawiające jest jednak, dlaczego w teście gorącej płytki obserwowano osłabienie analgetycznego działania morfiny, natomiast efekt ten nie wystąpił w teście immersji ogona, skoro w obu przypadkach zastosowano ten sam bodziec bólowy (termiczny). Wydaje się, że jedynym logicznym wytłumaczeniem tej rozbieżności może być fakt, iż w badaniu immersji ogona reakcja na termiczny bodziec nocycetywny integrowana jest jedynie na poziomie rdzenia kręgowego (jest to tzw. odruch rdzeniowy), natomiast w teście wycofania łapy w odpowiedzi na ten sam bodziec (termiczny) zaangażowane są również inne struktury zlokalizowane w wyższych piętrach OUN [22,23]. Można więc sądzić, że biologiczne reakcje mogą się różnić w zależności od tego, czy integracja następuje jedynie na poziomie rdzenia kręgowego, czy jest wypadkową współdziałania ośrodków rdzeniowych i ponadrdzeniowych (wyższe piętra OUN).

W teście wicia oceniającym ból trzewny stwierdzono, że morfina wywiera silne i długotrwałe działanie przeciwbólowe u szczurów kontrolnych, co zgodne jest z doniesieniami innych autorów [24]. W zacytowanym badaniu wykazano ponadto, że u zwierząt z leżą 5,7-DHT analgetyczne działanie stosowanego leku

było istotnie słabsze, co przemawia za tym, że dla prawidłowego działania narkotycznych leków przeciwbólowych niezbędne jest zachowanie integralności ośrodkowego układu serotonergicznego.

Dane z piśmiennictwa również wskazują, że transmisja serotonergiczna w mózgu odgrywa znaczącą rolę w przeciwbólowych efektach opioidów, co ustalono m.in. dzięki badaniom z użyciem tzw. blokad receptorowych. Dogrul i wsp. [25] wykazali, że analgetyczne działanie morfiny w teście immersji ogona może zostać zablokowane przez uprzednie podanie antagonisty receptora 5-HT₇ (związek SB 269970). Inni posługując się tym samym testem stwierdzili, że dokanałowe podanie antagonisty receptora 5-HT_{1A} (spiperon) lub antagonisty receptora 5-HT_{1C/2} (mianseryna) również osłabia analgetyczne działanie morfiny [26]. Co więcej, analgezja wywołana przez dostrukturalne (do istoty szarej okołowodociągowej) podanie morfiny u szczurów także może być zniesiona przez uprzednie wstrzyknięcie nieselektywnego antagonisty receptora 5-HT_{2A} (metysergid) [27].

Podobne obserwacje dotyczą blokad receptorowych (antagoniści receptora 5-HT₃) w modelach bólu trzewnego [28]. Warto dodać, że w dostępnym piśmiennictwie brak jakichkolwiek danych dotyczących wpływu chemicznej lezji układu serotonergicznego na przeciwbólowe efekty morfiny badane w modelach bólu trzewnego. Jedynie Korzeniewska-Rybicka i wsp. [29] posłużyli się zblizonym modelem doświadczalnym (podanie inhibitora syntezy 5-HT – p-CPA) i wykazali, że „wyłączenie” układu serotonergicznego nie wpływa na odczucie bólu trzewnego (po dootrzewnowej iniekcji 2% roztworu kwasu octowego) w grupie badanej w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi (badanie wykonano bez podania jakiegokolwiek analgetyku). Ci sami autorzy stwierdzili natomiast, że 8-OH-DPAT – agonista receptora 5-HT_{1A}, oraz klonidyna – agonista receptora α₂-adrenergicznego, znamienne hamowały liczbę wic, wskazując tym samym na istotny wpływ układu serotonergicznego oraz noradrenergicznego na odczuwanie bólu trzewnego.

W badaniach biochemicznych potwierdzono, że 5,7-DHT stosowana ICV u noworodków szczurzych wywołuje bardzo znaczny spadek zawartości 5-HT i jej metabolitu 5-HIAA w korze mózgowej czołowej (94% dla 5-HT; 95% dla 5-HIAA), co jest zgodne z danymi z piśmiennictwa [30]. Jednocześnie wykazano, że morfina znamienne zwiększa zawartość 5-HIAA w porównaniu z wynikami badania po podaniu soli fizjologicznej, pozostając zarazem bez wpływu na zawartość 5-HT. Dane z piśmiennictwa również dowodzą, że morfina (10 mg/kg) podwyższa zawartość metabolitu 5-HT, tj. 5-HIAA w mózgu (prążkowie i jądro półleżące przegrody) [31].

Ze względu na to, że lezja z użyciem 5,7-DHT wywołała bardzo znaczne spadki 5-HT i 5-HIAA, upośle-

dzając tym samym w znacznym stopniu „zdolności do biochemicznej reakcji” (w tym przypadku istotne zmiany zawartości 5-HT lub 5-HIAA) na stosowane analgetyki, aby uwidocznic, czy podawane leki wpływały na obrót (metabolizm) 5-HT, wyliczono dodatkowo wskaźnik metaboliczny f , który jest proporcją zawartości metabolitu (5-HIAA) do zawartości aminy (5-HT) w badanej strukturze mózgu. Wskaźnik ten obiektywizuje i jednocześnie informuje o wpływie stosowanej substancji na metabolizm określonej aminy. Wykazano, że nawet tak znaczne uszkodzenie ośrodkowego układu serotonergicznego pozostaje praktycznie bez wpływu na „profil metaboliczny” morfiny, która znamienne nasilała obrót 5-HT w korze mózgowej czołowej (mierzony wskaźnikiem f) u szczurów z lezją. Wyniki dotyczące grupy kontrolnej znajdują potwierdzenie w danych z piśmiennictwa. Desole i wsp. [32] zanotowali, że morfina (20 mg/kg)

nasila metabolizm 5-HT mierzony wskaźnikiem f w prążkowiu oraz strukturach limbicznych u szczurów. W dostępnym piśmiennictwie brak danych odnośnie do wpływu stosowanego leku na metabolizm 5-HT u szczurów z chemiczną lezją ośrodkowego układu serotonergicznego.

WNIOSEK

Trwała dysfunkcja ośrodkowego układu serotonergicznego zaburza analgetyczne działanie morfiny, co wskazuje, że w stanach klinicznych, w których dochodzi do upośledzenia funkcjonowania tego układu, można spodziewać się zmienionej reakcji biologicznej na opioidy.

PIŚMIENNICTWO

- Nowak P., Bortel A., Dabrowska J. et al. Amphetamine and mCPP effects on dopamine and serotonin striatal in vivo microdialysates in an animal model of hyperactivity. *Neurotox. Res.* 2007; 11: 131–144.
- Kostrzewa R.M., Kostrzewa J.P., Kostrzewa R.A., Nowak P., Brus R. Pharmacological models of ADHD. *J. Neural. Transm.* 2008; 115: 287–298.
- Brus R., Nowak P., Szkilnik R., Mikołajun U., Kostrzewa R.M. Serotonergics attenuate hyperlocomotor activity in rats. Potential new therapeutic strategy for hyperactivity. *Neurotox. Res.* 2004; 6: 317–325.
- Verdu B., Decosterd I., Buclin T. et al. Antidepressants for the treatment of chronic pain. *Drugs* 2008; 68: 2611–2632.
- Girard P., Coppé M.C., Verniers D. et al. Role of catecholamines and serotonin receptor subtypes in nefopam-induced antinociception. *Pharmacol. Res.* 2006; 54: 195–202.
- Bigal M.E., Krymchantowski A.V., Ho T. Migraine in the triptan era: progresses achieved, lessons learned and future developments. *Arq. Neuropsiquiatr.* 2009; 67: 559–569.
- Zhao Z.Q., Gao Y.J., Sun YG et al. Central serotonergic neurons are differentially required for opioid analgesia but not for morphine tolerance or morphine reward. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104: 14519–14524.
- Gao K., Chen D.O., Genzen J.R. et al. Activation of serotonergic neurons in the raphe nucleus is not necessary for morphine analgesia. *J. Neurosci.* 1998; 18: 1860–1868.
- O’Callaghan J.P., Holtzman S.G. Quantification of the analgesic activity of narcotic antagonists by a modified hot-plate procedure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1975; 192: 497–505.
- Janssen P.A.J., Niemegeers C.J.E., Dony J.G.H. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm-water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneim. Forsch. Drug Res.* 1963; 13: 502–507.
- Loram L.C., Mitchell D., Skosana M. et al. Tramadol is more effective than morphine and amitriptyline against ischaemic pain but not thermal pain in rats. *Pharmacol. Res.* 2007; 56: 80–85.
- Randall L.O., Selitto J.J. A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1957; 111: 409–415.
- Hernández L., Romero A., Almela P et al. Tolerance to the antinociceptive effects of peripherally administered opioids. Expression of beta-arrestins. *Brain Res.* 2009; 1248: 31–39.
- Acton J., McKenna J.E., Melzack R. Amitriptyline produces analgesia in the formalin pain test. *Exp. Neurol.* 1992; 117: 94–96.
- 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.
- Poveda R., Planas E., Pol O. et al. Interaction between metamizol and tramadol in a model of acute visceral pain in rats. *Eur. J. Pain* 2003; 7: 439–448.
- Nowak P., Jochem J., Żwirska-Korcza K. et al. Ontogenetic noradrenergic lesion alters histaminergic activity in adult rats. *Neurotox. Res.* 2008; 13: 79–83.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rahman W., Suzuki R., Webber M. et al. Depletion of endogenous spinal 5-HT attenuates the behavioural hypersensitivity to mechanical and cooling stimuli induced by spinal nerve ligation. *Pain* 2006; 123: 264–274.
- Bohn L.M., Lefkowitz R.J., Caron M.G. Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in (beta)arrestin-2 knock-out mice. *J. Neurosci.* 2002; 22: 10494–10500.
- Pitcher G.M., Yashpal K., Coderre T.J. et al. Mechanisms underlying antinociception provoked by heterosegmental noxious stimulation in the rat tail-flick test. *Neuroscience* 1995; 65: 273–281.
- Gallantine E.L., Meert T.F. Antinociceptive and adverse effects of mu- and kappa-opioid receptor agonists: a comparison of morphine and U50488-H. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2008; 103: 419–427.
- Dogrul A., Seyrek M. Systemic morphine produce antinociception mediated by spinal 5-HT7, but not 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the spinal cord. *Br. J. Pharmacol.* 2006; 149: 498–505.
- 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.
- Schul R., Frenk H. The role of serotonin in analgesia elicited by morphine in the periaqueductal gray matter. *Brain Res.* 1991; 556: 353–357.
- 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.
- Korzeniewska-Rybicka I., Płaźnik A. Role of serotonergic and noradrenergic systems in a model of visceral pain. *Pol. J. Pharmacol.* 2001; 53: 475–480.
- Kostowski W., Bidziński A., Krzaścik P. et al. Age-dependent effects of 5,7-dihydroxytryptamine on serotonin transporter in different brain areas in the rat. *Pol. J. Pharmacol.* 2004; 56: 383–389.
- Vihavainen T., Mijatovic J., Piepponen T.P. et al. Effect of morphine on locomotor activity and striatal monoamine metabolism in nicotine-withdrawn mice. *Behav. Brain Res.* 2006; 173: 85–93.
- Desole M.S., Esposito G., Fresu L. et al. Effects of morphine treatment and withdrawal on striatal and limbic monoaminergic activity and ascorbic acid oxidation in the rat. *Brain Res.* 1996; 723: 154–161.