



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**  
**ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ**

**ПОЛИНА ИВАНОВА МАТЕЕВА**

**БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ И МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ  
НА НОВИ NOR-РЕЦЕПТОРНИ ЛИГАНДИ ВЪРХУ ГЛАДКИ  
МУСКУЛИ И МОДЕЛ НА ОСТРО ПЕРИФЕРНО ВЪЗПАЛЕНИЕ**

**ДИСЕРТАЦИЯ**

за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”

**Научна специалност:** “Фармакология, вкл. фармакокинетика и  
химиотерапия ”, шифър 03.01.24.

**Научен ръководител:**

Доц. д-р Росица Замфирова

СОФИЯ  
2013 г.

## СЪДЪРЖАНИЕ

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ</b> .....                                                     | 4  |
| <b>ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....                                                                             | 5  |
| <b>I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР</b> .....                                                                  | 7  |
| <b>1.1. НОЦИЦЕПТИН И НОЦИЦЕПТИНОВ РЕЦЕПТОР – ОТКРИВАНЕ И НОМЕНКЛАТУРА</b> .....                    | 7  |
| <b>1.2. СИНТЕЗ И МЕТАБОЛИЗЪМ НА НОЦИЦЕПТИНА</b> .....                                              | 11 |
| <b>1.3. КЛЕТЪЧЕН МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ НА НОЦИЦЕПТИНА</b> .....                                    | 14 |
| <b>1.4. РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА NOP-РЕЦЕПТОРА И ПО-ВАЖНИ БИОЛОГИЧНИ ЕФЕКТИ<br/>НА НОЦИЦЕПТИНА</b> .....   | 16 |
| 1.4.1. Ефекти върху болката .....                                                                  | 18 |
| 1.4.2. Ефекти върху обучение и запаметяване .....                                                  | 20 |
| 1.4.3. Ефекти върху локомоцията и мотивацията .....                                                | 20 |
| 1.4.4. Ефекти върху апетита .....                                                                  | 21 |
| 1.4.5. Ефекти върху невроендокринните функции .....                                                | 21 |
| 1.4.6. Ефекти върху гладки мускули .....                                                           | 21 |
| 1.4.7. Ефекти върху сърдечно-съдовата система .....                                                | 22 |
| 1.4.8. Ефекти върху дихателната система .....                                                      | 22 |
| 1.4.9. Ефекти върху отделителната система .....                                                    | 23 |
| 1.4.10. Ефекти върху имунната система .....                                                        | 23 |
| <b>1.5. УЧАСТИЕ НА НОЦИЦЕПТИНА В ПРОЦЕСИТЕ НА ВЪЗПАЛЕНИЕ</b> .....                                 | 24 |
| <b>1.6. ЗАВИСИМОСТ МЕЖДУ СТРУКТУРАТА НА НОЦИЦЕПТИНА И<br/>БИОЛОГИЧНАТА АКТИВНОСТ</b> .....         | 25 |
| <b>II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....                                                                      | 38 |
| <b>III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b> .....                                                               | 41 |
| <b>3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ПОСТАНОВКА ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ИЗОЛИРАНИ ОРГАНИ</b> ....                      | 41 |
| 3.1.1. Приготвяне на препарати от <i>vas deferens</i> на плъх .....                                | 42 |
| 3.1.2. Метод на полева електрическа стимулация .....                                               | 42 |
| 3.1.3. Фармакологичен анализ .....                                                                 | 43 |
| 3.1.4. Експериментален протокол на опитите <i>in vitro</i> върху<br>гладкомускулни препарати ..... | 44 |
| <b>3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА ОСТРО ПЕРИФЕРНО ВЪЗПАЛЕНИЕ</b> .....                              | 45 |
| 3.2.1. Експериментален протокол на опитите <i>in vivo</i> върху остро                              |    |

|                                                                                                                                                                                                                                            |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| периферно възпаление - първа серия.....                                                                                                                                                                                                    | 47         |
| 3.2.2. Експериментален протокол на опитите <i>in vivo</i> върху остро<br>периферно възпаление - втора серия .....                                                                                                                          | 48         |
| <b>3.3. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ .....</b>                                                                                                                                                                                           | <b>51</b>  |
| <b>3.4. ИЗПОЛЗВАНИ ФАРМАКОЛОГИЧНИ СРЕДСТВА .....</b>                                                                                                                                                                                       | <b>51</b>  |
| 3.4.1. Фармакологични субстанции .....                                                                                                                                                                                                     | 51         |
| 3.4.2. Разтвори и реагенти .....                                                                                                                                                                                                           | 54         |
| <b>IV. РЕЗУЛТАТИ.....</b>                                                                                                                                                                                                                  | <b>55</b>  |
| <b>4.1. ЕКСПЕРИМЕНТИ <i>IN VITRO</i> ВЪРХУ ИЗОЛИРАНИ ГЛАДКОМУСКУЛНИ ПРЕПАРАТИ<br/>    ОТ VAS DEFERENS НА ПЛЪХ, СТИМУЛИРАНИ С LFES .....</b>                                                                                                | <b>55</b>  |
| 4.1.1. Изследване на биологичната активност на серия нови производни<br>на N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub> модифицирани в девета и/или тринадесета позиция<br>от пептидната верига .....                                                        | 55         |
| 4.1.2. Изследване на биологичната активност на серия модифицирани в<br>N-края нови производни на N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub> с аминоксфосфонатна част .....                                                                                 | 64         |
| 4.1.3. Изследване на биологичната активност на серия модифицирани в N-края<br>нови аналози на хексапептида Ac-RYYRWK-NH <sub>2</sub> с аминоксфосфонатна част .....                                                                        | 71         |
| <b>4.2. ЕКСПЕРИМЕНТИ <i>IN VIVO</i> ВЪРХУ МОДЕЛ НА ОСТРО ПЕРИФЕРНО ВЪЗПАЛЕНИЕ.....</b>                                                                                                                                                     | <b>75</b>  |
| 4.2.1. Изследване на ефектите на N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub> и структурните му<br>аналози [Orn <sup>9</sup> ]N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub> и [Dab <sup>9</sup> ]N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub> върху<br>предизвикано с λ-карагенан възпаление..... | 75         |
| 4.2.2. Проучване на връзката в механизма на действие на<br>N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub> , структурния му аналог [Orn <sup>9</sup> ]N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub><br>и канабиноидите върху предизвикано с λ-карагенан възпаление .....           | 79         |
| <b>V. ОБСЪЖДАНЕ .....</b>                                                                                                                                                                                                                  | <b>87</b>  |
| <b>VI. ИЗВОДИ .....</b>                                                                                                                                                                                                                    | <b>98</b>  |
| <b>VII. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....</b>                                                                                                                                                                              | <b>100</b> |
| <b>VIII. ПРИЛОЖЕНИЯ .....</b>                                                                                                                                                                                                              | <b>101</b> |
| 8.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....                                                                                                                                                                                     | 101        |
| 8.2. НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....                                                                                                                                                                               | 102        |
| 8.3. ЦИТИРАНИЯ НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА<br>ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....                                                                                                                                                          | 103        |
| <b>Библиография .....</b>                                                                                                                                                                                                                  | <b>105</b> |

## СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

|                   |   |                                                                                                                   |
|-------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Arg               | – | аргинин                                                                                                           |
| CB <sub>1</sub>   | – | канабиноиден рецептор                                                                                             |
| CG                | – | λ-карагенан                                                                                                       |
| CGRP              | – | калцитонин-ген-свързан пептид                                                                                     |
| CnAF              | – | {1-[(метоксифосфоно)метиламино]циклоалкан<br>карбоксилна киселина}                                                |
| Dab               | – | диаминобутанова киселина                                                                                          |
| Dap               | – | диаминопропанова киселина                                                                                         |
| DMSO              | – | диметил сулфоксид                                                                                                 |
| E <sub>max</sub>  | – | максимален ефект                                                                                                  |
| i.c.v.            | – | интрацеребровентрикуларно въвеждане                                                                               |
| i.p.              | – | интраперитонеално въвеждане                                                                                       |
| i.pl.             | – | интраплантарно въвеждане (подкожно в лапа)                                                                        |
| i.t.              | – | интратекално въвеждане                                                                                            |
| IUPHAR            | – | Международен съюз по фармакология                                                                                 |
| LFES              | – | нискочестотна електрическа стимулация                                                                             |
| Lys               | – | лизин                                                                                                             |
| Nal               | – | налоксон                                                                                                          |
| NalBzOH           | – | налоксон бензоилхидразон                                                                                          |
| N/OFQ             | – | ноцицептин/орфанин                                                                                                |
| NOP               | – | ноцицептинов рецептор                                                                                             |
| Orn               | – | орнитин                                                                                                           |
| pEC <sub>50</sub> | – | отрицателен десетичен логаритъм от ефективната<br>моларна концентрация, предизвикваща 50% от<br>максималния ефект |
| Phe               | – | фенилаланин                                                                                                       |
| SP                | – | субстанция П                                                                                                      |
| TRPV1             | – | ванилоиден рецептор                                                                                               |
| цАМФ              | – | цикличен аденозинмонофосфат                                                                                       |

## ВЪВЕДЕНИЕ

Известно е съществуването на биологично активни пептиди в централната и в периферната нервна система. През последните години, до голяма степен се промениха представите за тяхната роля в организма. Доказано бе, че някои пептиди имат невромедиаторни и/или невромодулаторни свойства, а част от тях са колокализирани заедно с други класически невромедиатори. Установени бяха редица "несвойствени" ефекти на отдавна известни невропептиди и бяха открити нови ендогенни пептиди, чиито централни и периферни ефекти, както и механизмите на действието им все още не са напълно проучени. Това е причина тъканното разпределение на невропептидите, физиологичните и фармакологичните им отнасяния да са обект на интензивни проучвания през последните години. Подобни знания биха разкрили перспектива за разработване на нови селективни, мощни и безопасни лекарствени средства на базата на ендогенни пептиди.

В тази насока, от особен интерес са изследванията върху сравнително неотдавна открития ендогенен пептид ноцицептин (N/OFQ). Установено е, че ноцицептиновата пептидергична система е разпространена в централната и периферната нервна система – в различни участъци на главния мозък, в гръбначния мозък, в симпатикови, парасимпатикови и сетивни неврони. Специфичното разпределение на N/OFQ и ноцицептиновия рецептор (NOP) показва, че те участват в модулирането на редица биологични процеси (възприемане на болка, обучение и запаметяване, двигателна активност и др.) и функции (на сърдечно-съдовата, гастроинтестиналната, дихателната, отделителната системи и др.), контролирани от нервната система.

Съпоставянето на наличните в литературата данни, че N/OFQ потиска ефектите на активирани ванилоидни (TRPV1) рецептори, които от своя страна, в някои случаи, медиират инхибиторното действие на канабиноидите върху болката и острите възпалителни процеси, предполага съществуването на връзка в механизмите на действие на ноцицептина и канабиноидите при възпалителни процеси, с възможно участие на ванилоидните рецептори в тях. Доказването на

такава връзка би имало теоретично значение и за разкриване на механизма на действие на N/OFQ при остър възпалителен процес в периферията.

Според литературните данни, ефектите на N/OFQ силно зависят от локализацията на неuropeптида и рецепторите му в организма, поради което механизмите, чрез които се осъществяват, могат да бъдат различни. Една от причините за ненапълно разкритите механизми на действие на ноцицептина е недостатъчният брой високоафинитетни, стабилни (в организма) лиганди за NOP-рецепторите и в частност – практическата липса на селективни антагонисти.

“Структура-активност” проучванията в тази посока биха улеснили идентифицирането на нови молекули, които селективно да активират (агонисти) или блокират (антагонисти) NOP-рецептора, което е от голямо значение за по-пълното изясняване на ролята на N/OFQ/NOP-системата при различни физиологични и патофизиологични състояния. Освен, че дават възможност за разкриване на механизмите на действие на ноцицептина, такива високоефективни NOP-рецепторни лиганди могат да намерят практическо приложение за разработване на нови средства за експерименталната фармакология или в по-далечна перспектива – за създаване на потенциални терапевтични средства за клиничната практика на тяхна основа. Антагонистите биха били полезни при намален гастроинтестинален мотилитет, както и за подобряване на паметовите функции. Съединения с агонистична активност биха намерили приложение при лечение на невропатична болка, повишена възбудимост, опиятна зависимост, хипертония, анорексия, церебрална исхемия, астматични пристъпи, някои възпалителни процеси и др. Съобщават се данни, че NOP-рецепторни антагонисти са обещаващи и при разработването на нови антипаркинсонови лекарства (Martí et al., 2005). Поради тази причина, N/OFQ/NOP-системата продължава да предизвиква неотслабващ научноизследователски интерес (Zaveri 2003).

## **I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР**

### **1.1. НОЦИЦЕПТИН И НОЦИЦЕПТИНОВ РЕЦЕПТОР – ОТКРИВАНЕ И НОМЕНКЛАТУРА**

Ендогенните опиоидни пептиди (енкафилини, ендорфини, динарфини и др.) се синтезират и освобождават от неврони разположени в централната и в периферната нервна система. Тези пептиди, както и екзогенните опиоиди упражняват своите ефекти, чрез взаимодействие и активиране на специфични мембранни рецептори, принадлежащи към три главни субтипа на класическите опиоидни рецептори -  $\mu$ ,  $\kappa$ , и  $\delta$  (Corbett et al., 2006). Опиоидните пептиди са семейство от близки по своята структура молекули, които имат редица фармакологични ефекти и за които се смята че участват в контрола на множество физиологични функции. Това става причина опиоидните пептиди да бъдат интензивно и широко изучавани през последните десетилетия от много изследователски групи, в търсене на нови и ефективни аналгетици.

Идентифицирането на опиоидното „семейството” и клонирането на трите типа класически опиоидни рецептори  $\mu$ ,  $\delta$  и  $\kappa$ , първоначално наречени съответно MOR-1, DOR-1 и KOR-1 (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992; Chen et al., 1993; Yasuda et al., 1993) довежда до друго важно откритие. През 1994 г., за първи път, няколко лаборатории паралелно описват нов, четвърти рецепторен клон, с неидентифициран ендегенен лиганд. Опиоидните пептиди не проявяват или показват незначителен афинитет към този нетипичен субтип рецептор. Поради трудността да бъде охарактеризиран, новият рецептор бива смятан от много изследователи за орфанинов (от англ. “orphan” – сираче). Номенклатурата по отношение на ноцицептиновия рецептор за известен период от време остава неясна и объркваща.

Поради установената ~60% хомоложност с опиоидните рецептори, в някои трансмембранни интрацелуларни региони достигаща дори до 80% (Mollereau et al., 1994; Mollereau et al., 1996; Henderson and McKnight, 1997), този нов “опиоидо-подобен” рецептор (от англ. – opioid receptor-like 1) е асоцииран с опиоидната рецепторна „суперфамилия” и първоначално е наречен ORL1 (според Receptor and

ion channel nomenclature supplement, Trends Pharmacol. Sci., 1999); (Bunzow et al., 1994; Fukuda et al., 1994; Mollereau et al., 1994; Nishi et al., 1994; Wang et al., 1994). В литературата се откриват и няколко ранни съобщения, в които се докладва за близко сходство между ORL1 рецептора и  $\kappa_3$  рецептора, но се изказва заключението, че те не са идентични (Pan et al., 1994). Според много автори, от гледна точка на структурата ORL1 и опиоидните рецептори принадлежат към едно и също „семейство”, и ORL1 е смятан за опиоиден рецептор. В резултат на това по-късно, съгласно номенклатурата за опиоидните рецептори (Dhawan et al., 1996), те биват преименовани на  $OP_1$  ( $\delta$ ),  $OP_2$  ( $\kappa$ ),  $OP_3$  ( $\mu$ ) и  $OP_4$  (ORL1) (Hamon, 1998).

Според други автори и по друга класификация, обаче, ORL1 не трябва да бъде разглеждан като член на опиоидното рецепторно „семейство” и е оставен извън него (Dhawan et al., 1998). Причината за това е, че въпреки голямото структурно сходство с опиоидните рецептори, ORL1 не се свързва с очаквания висок афинитет с опиоидите и е нечувствителен към неселективният за класическите опиоидни рецептори антагонист налоксон (Nal) (Meunier et al., 1995; Reinshield et al., 1995). От друга страна, ORL1 взаимодейства с други лиганди за опиоидните рецептори, като например налоксон бензоилхидразон (NalBzOH) и бупренорфин (Mollereau et al., 1994).

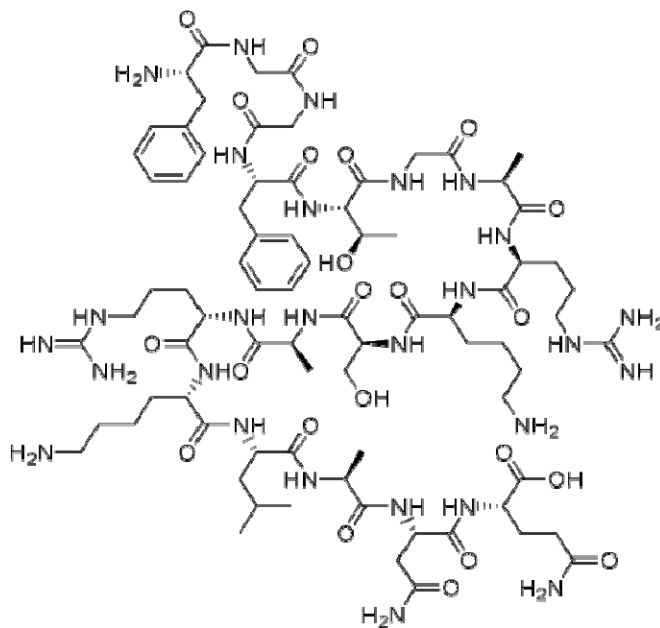
Трябва са се отбележи, че поради дискуссионния характер на изброените факти и различните критерии, рецепторната номенклатура се променя редица пъти, като са използвани следните други абривиатури за наименование на новоткрития рецептор (NCR или NocR), орфанинов рецептор (OFQR), ноцицептин-орфанин FQ рецептор (NOR, по аналогия с MOR, DOR и KOR) и  $OP_4$  по препоръки на Hamon (1998).

След разисквания за унифициране на номенклатурата на опиоидните рецептори, в съответствие с последното издание на Международния съюз по фармакология IUPHAR (International Union Of Pharmacology) за рецепторно характеризиране и класифициране, новата препоръка за абривиатурата се променя на MOR, DOR, KOR и NOR - ноцицептинов/орфанин FQ пептиден рецептор (Cox et al., 2000; Chiou et al., 2007).



Необичайните характеристики на този новооткрит рецептор довеждат до предположението за съществуването на ендогенна субстанция като негов естествен лиганд, различен от известните до момента ендогенни опиоидни пептиди.

Скоро след това, през 1995 г., ендогенният лиганд за NOP-рецептора е идентифициран. Едновременно в две независими лаборатории от мозъчна тъкан е изолиран опиоидоподобен невропептид. Двете изследователски групи му дават различни имена. Швейцарската го наименова орфанин FQ (Reinscheid et al., 1995), поради неговия афинитет за орфаниновия рецептор, като F и Q посочават първата и последната аминокиселина, фенилаланин и глутамин. Френската група го нарича ноцицептин (Meunier et al., 1995), поради установената му *in vivo* проноцицептивна активност - инжектиран интрацеребровентрикуларно (i.c.v.) на мишки води до понижаване на „hot-plate escape jumping latency” (Meunior et al., 1995) и „tail-flick latency” (Reinscheid et al., 1995). Химичната структура на ноцицептина е представена на Фиг. 1. Нито едно от двете наименования не доминира и повечето лаборатории използват и двете заедно - ноцицептин/орфанин FQ или N/OFQ. Следните други абривиатури са използвани за наименование на ноцицептина: NC, Noc, Noci, oFQ.



**Фиг. 1.** Химична структура на ноцицептин (Edgar181, Wikipedia).

Ноцицептиновият рецептор е изолиран и клониран от няколко биологични вида, от редица изследователски групи и показва значителна идентичност в аминокиселинната последователност при отделните видове, като първоначално се среща под различни имена, а именно: при човек - ORL1 (Mollereau et al., 1994), при плъх - LC132, XOR1, Ratxor1, C3, ROR-C (Chen et al., 1993; Bunzow et al., 1994; Fukuda et al., 1994; Keith et al., 1994; Wang et al., 1994; Wick et al., 1994; Lachowicz et al., 1995;), при мишка - KOR-3, MOR-C (Nishi et al., 1994; Pan et al., 1994; Pan et al., 1995) и при прасе (Osinski et al., 1999). При плъх и мишка, рецепторът се различава само по две аминокиселини – една в N- и една в C- края (Wick et al., 1994; Matthes et al., 1996).

Обобщаването на резултатите от детайлното охарактеризиране на основните фармакологични параметри - pKi, pEC<sub>50</sub>/pA<sub>2</sub> на нативни NOP-рецептори от различни видове (мишка, морско свинче и плъх), както и на рекомбинантни човешки NOP-рецептори, показва, че NOP-рецепторите в четирите вида са сходни (Dooley and Houghten, 1996; Varani et al., 1998; Bigoni et al., 1999b; Calò et al., 1998a; Calò et al., 2000a).

Не е изненадващо, че висока степен на хомоложност (~60%) се установява не само между класическите опиоидните рецептори и NOP-рецептора, но също така и между аминокиселинната последователност на ноцицептина и тази на ендогенните опиоидни пептиди, особено динорфин А (Табл. 1), (Meunier et al., 1995; Reinshield et al., 1995). Както N/OFQ, така и динорфин А се състоят от 17 аминокиселини.

| Име        | Аминокиселинна последователност                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ноцицептин | Phe <sup>1</sup> -Gly <sup>2</sup> -Gly <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup> -Thr <sup>5</sup> -Gly <sup>6</sup> -Ala <sup>7</sup> -Arg <sup>8</sup> -Lys <sup>9</sup> -Ser <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Arg <sup>12</sup> -Lys <sup>13</sup> -Leu <sup>14</sup> -Ala <sup>15</sup> -Asn <sup>16</sup> -Gln <sup>17</sup><br>(или FGGFTGARKSARKLANQ) |
| Динорфин А | Tyr <sup>1</sup> -Gly <sup>2</sup> -Gly <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup> -Leu <sup>5</sup> -Arg <sup>6</sup> -Arg <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Arg <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Lys <sup>11</sup> -Leu <sup>12</sup> -Lys <sup>13</sup> -Trp <sup>14</sup> -Asp <sup>15</sup> -Asn <sup>16</sup> -Gln <sup>17</sup><br>(или YGGFLRRIRPKLKWDNQ) |

**Таблица 1.** Аминокиселинна последователност на ноцицептин и динорфин А.

Въпреки сходството в структурата на пептидите и техните рецептори, ноцицептинът осъществява ефектите си чрез активиране и селективно свързване с изключително голям афинитет със собствения си NOP-рецептор (Reinscheid et al., 1995; Meunier et al., 1997).

Идентифицирането на неuropeптида ноцицептин като ендегенен лиганд за NOP-рецептора предизвиква бързо нарастващ интерес за установяване на физиологичната значимост на този пептид. Това инициира голям брой изследвания, целящи изучаването на клетъчните и интегративни ефекти на N/OFQ и разкриването на механизма на неговото действие. Броят на публикациите в тази област постоянно нараства, но натрупаната информация за действията и ефектите на N/OFQ съдържа и немалко противоречиви данни.

## **1.2. СИНТЕЗ И МЕТАБОЛИЗЪМ НА НОЦИЦЕПТИНА**

Както повечето неuropeптиди, N/OFQ се освобождава в активна форма след протеолитично разграждане на по-голяма прекурсорна молекула (полипептид)-препроноцицептин (Nothacker et al., 1996). Препроноцицептиновата прекурсорна молекула съдържа в 30-аминокиселинната си последователност няколко двойки базични аминокиселини, които предоставят възможни места за процесинг (разцепване на веригата при зрееенето). Зрееенето на биологично активните пептиди се осъществява посредством определени класове ензими, които разцепват аминокиселинната последователност в местата, където се намират двойките катионни остатъци. По този начин, от полипептида се освобождават ноцицептин, ноцистатин и орфанин 2 (или FQ2). Последните два пептида обаче, не взаимодействат с NOP-рецептора (Mollereau et al., 1996; Nothacker et al., 1996). Ноцистатинът действа като функционален антагонист на N/OFQ, има антиноцицептивна активност, осъществена вероятно чрез действие върху различен рецептор (Okuda-Ashitaka et al., 1998).

Веднъж освободен, N/OFQ подлежи на метаболизиране от различни типове протеолитични ензими до фрагменти с различна дължина (Фиг. 2).

Деактивирането на N/OFQ се осъществява по два основни метаболитни пътя – под действието на ензимите аминокептидаза N и ендепептидаза 24.15 (Montiel et al., 1997). Аминокептидаза N отцепва първата аминокиселина Phe<sup>1</sup> от аминокрая (или азотен; N-край) на пептидната верига на N/OFQ, при което се получава фрагмента N/OFQ(2-17) (или GGFTGARKSARKLANQ). Той не взаимодейства с активния център на NOP-рецептора (Dooley and Houghten, 1996). Получаването на неактивно

съединение при отцепването на тази аминокиселина се потвърждава и от други автори (Matthes et al., 1996).



**Фиг. 2.** Схема на метаболизма на ноцицептин (FGGFTGARKSARKLANQ). **APN** – аминопептидаза N, **EP** – ендопептидаза. Представени са основните фрагменти (Calò et al., 2000a).

Ендопептидаза 24.15 действа върху пептидните връзки Ala<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>, Ala<sup>11</sup>-Arg<sup>12</sup> и Arg<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>, във вътрешната част на пептидната верига на N/OFQ, което довежда до получаване на късоверижните метаболити N/OFQ(1-12) (или FGGFTGARKSAR), N/OFQ(1-11) (или FGGFTGARKSA) и N/OFQ(1-7) (или FGGFTGA).

Модифицирането на всички връзки, които са прицелни места на действие на пртеолитичните ензими, дава възможност за създаване на стабилни и биологично активни производни и метаболити, неподатливи на ензимното раграждане. Те са от особен интерес за много изследователи.

В литературата се съобщават данни за участието и на друг ензим в разграждането на ноцицептина. Това е карбоксипептидаза, която съкращава ноцицептиновата верига откъм свободния карбоксилен край (въглероден или C-край). По този начин, невропептидът първо се превръща в N/OFQ(1-13), след което, вероятно от същия ензим, до N/OFQ(1-9) (Sandin et al., 1999). Действието на този ензим е установен *in vivo* в хипокамп на плъх. Подобни резултати са получени и от Vlaskovska и съавтори (1999), но при *in vitro* изследвания, с ензими от различни

клетъчни култури (U1690 – човешки белодробни ракови клетки, SHSY5Y – човешки невробластомни клетки и първична култура от корови мозъчни клетки на плъх).

Метаболизмът на N/OFQ е времезависим и различните фрагменти се появяват последователно за период от 15-60 мин. Може да има разлика в последователността и съотношението между отделните метаболити, която се определя от вида на изследвания препарат. Големите пептидни молекули се поддават по-трудно на ензимното разграждане. Затова и хидролизирането на N/OFQ настъпва сравнително бавно, в сравнение с пентапептида енкефалин (Safavi A. and Hersh, 1995; Yu et al., 1996). Интересно е да се отбележи, че въпреки еднаквата дължина с динорфин А, ноцицептинът се разгражда по-бавно от него, поради това, че двата пептида имат различни метаболитни пътища. Следователно, може да се очаква модулиращите ефекти на N/OFQ да са относително продължителни (Montiel et al., 1997).

Литературните данни относно физиологичното значение и ефектите на метаболитите на ноцицептина са много противоречиви. При различни *in vivo* изследвания (при i.c.v. и i.t. въвеждане) е установено, че съкращаването на пептидната веригата от С-края от N/OFQ (1-17) до N/OFQ(1-13) и N/OFQ(1-11), води до понижаване, а по-нататъшното съксяване до N/OFQ(1-9) и N/OFQ(1-7) - до почти пълна загуба на антиноцицептивна активност (Rossi et al., 1997; Katsuyama et al., 2011). Важно е да се отбележи, че аналгетичният ефект на N/OFQ(1-13) и N/OFQ(1-11) е по-слаб, но по-продължителен, в сравнение с N/OFQ, а при метаболитите N/OFQ(1-11) и N/OFQ(1-7) се появява афинитет освен към NOP-рецептора и към опиоидните рецептори. N/OFQ(1-13) осъществява аналгетичния си ефект само посредством NOP-рецепторите (Katsuyama et al., 2011).

Според Sandin и съавтори (1999), по-слабият ефект (в сравнение с N/OFQ) на N/OFQ(1-13) вероятно се дължи на бързото му вторично ензимно разграждане от карбоксипептидазата до още по-слабо активния метаболит N/OFQ(1-9). С цел предотвратяване на това разграждане свободната карбоксилна група се защитава чрез амидиране. Получените при такова амидиране пептиди - N/OFQNH<sub>2</sub> и N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> имат активност съизмерима с тази на N/OFQ (Calò et al., 1998a;

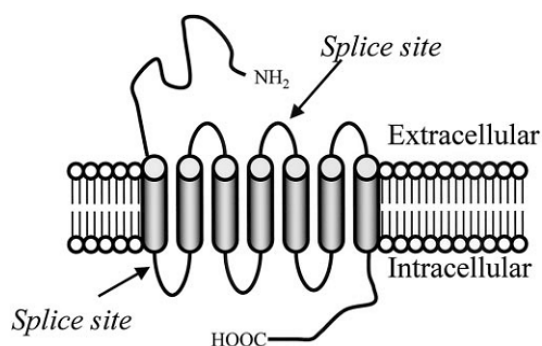
Calò et al., 2000c). В някои случаи дори, след амидирането на пептидите активността се повишава, както например се получава при N/OFQ(1-17)NH<sub>2</sub> в сравнение N/OFQ(1-17), установено при *in vivo* изследвания (по Calò et al., 2000a).

При обобщаване на намерените данни, възниква въпросът, дали ноцицептинът взаимодейства директно с рецепторите или негови фрагменти, свързвайки се с тях, могат да предизвикат същия или различен фармакологичен ефект и така да удължат или променят ефекта. Такъв механизъм не е невъзможен, като се има предвид краткия биологичен живот на пептида (Noble and Roques, 1997).

### 1.3. КЛЕТЪЧЕН МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ НА НОЦИЦЕПТИНА

Свързването на N/OFQ с NOP-рецептора е доказано за първи път, чрез използването на радиоактивния лиганд <sup>125</sup>I-[Tyr<sup>14</sup>]N/OFQ (Reinscheid et al., 1995; Ardati et al., 1997). Други често използвани лиганди, белязани с радиоактивни изотопи са <sup>3</sup>H-N/OFQ (Dooley and Houghten, 1996) и <sup>3</sup>H-ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> (Thomsen et al., 2000).

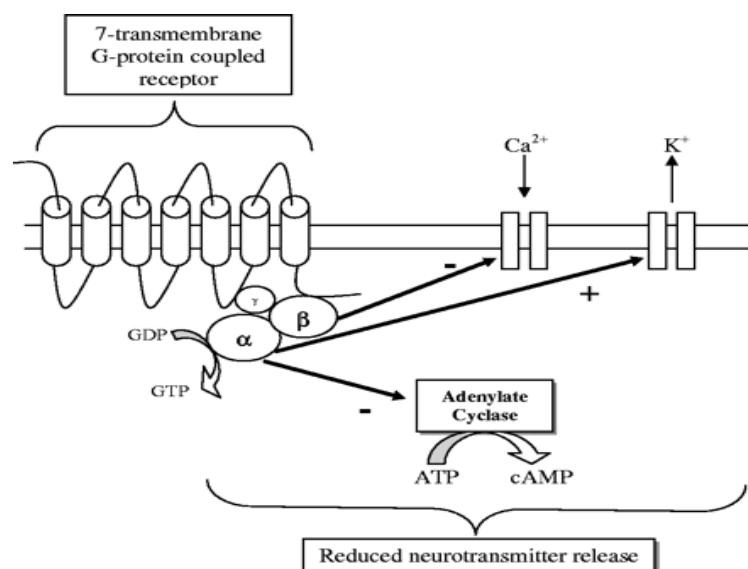
Подобно на класическите опиоидни рецептори, клонираните NOP-рецептори са идентифицирани чрез техния генетичен код и са типични Gi/Go-протеинкуплирани трансмембранны рцептори със седем домейна 7TM (g370 P41146<sup>AS</sup>) (Фиг. 3). Предполага се, че свързващата част на рецептора обхваща няколко трансмембранны домейна (Topham et al., 1998; Mouledous et al., 2000).



**Фиг. 3.** Схематично представяне на NOP-рецептора (Mogil and Pasternak, 2001).

NOR-опиоидния рецептор, както и класическите опиоидни рецептори MOR ( $\mu$ ), KOR ( $\kappa$ ) и DOR ( $\delta$ ), са свързани с инхибиторни G-протеини и имат подобни трансдукционни механизми.

Активирането на NOR- и опиоидните рецептори води до: 1) затваряне на потенциалзависими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналите (Knoflach et al., 1996); 2) стимулиране на калиевия ( $\text{K}^+$ ) поток навън, водещо до хиперполяризация (Connor et al., 1996; Vaughan and Christie, 1996; Ikeda et al., 1997; Vaughan et al., 1997; Moran et al., 2000); и 3) редуциране на продукцията на цикличния аденозинмонофосфат (цАМФ) чрез инхибиране на активността на аденилатциклазата (N/OFQ инхибира средно с около 84% предизвиканото с форсколин натрупване на цАМФ – Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995; Hawes et al., 2000). Общо, резултатът е понижаване на невроналаната клетъчна възбудимост, водещо до потискане на предаването на нервните импулси заедно с инхибиране на невротрансмитерното освобождаване (Фиг. 4), (McDonald and Lambert, 2005).



**Фиг. 4.** Структура на 7 трансмембранен опиоиден G-куплиран рецептор.

Характерно за G-куплираните рецептори е, че няма директна връзка на лиганда с ефекторните протеини. G-белтъците съществуват под формата на хетеротример, съставен от 3 различни субединици  $\alpha$ ,  $\beta$ , и  $\gamma$ . G-белтъкът е в неактивно състояние, когато към него е свързана молекула ГДФ (гуанозиндифосфат или GDP). След свързване на лиганда с рецептора, става замяна на ГДФ с ГТФ (гуанозинтрифосфат или GTP), при което отделните субединици на G-белтъка дисоциират.  $\text{G}\alpha$ -субединицата взаимодейства с  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ -те канали и аденилатциклазата [(която првъръща аднозинтрифосфат (ATP) в цикличен аденозинмонофосфат (cAMP)] (McDonald and Lambert, 2005).

Клетъчните ефекти на N/OFQ предполагат като цяло инхибиторно действие, което в повечето случаи се осъществява чрез пресинаптично потискане на трансмитерното освобождаване (Liebel et al., 1997; Vaughan et al., 1997; Yu et al., 1997; Vlaskovska and Kasakov, 2000).

Независимо от описаните прилики в общия механизъм на действие на клетъчно ниво, NOP-рецепторът се различава от класическите опиоидни рецептори по фармакологичните си характеристики. Фармакологичният профил на N/OFQ е различен от и в редица случаи е противоположен на този на опиоидите (Connor et al., 1999; Mogil et al., 2001; Calò et al., 2000a; Calò et al., 2002a). Например, N/OFQ предизвиква хипералгезия или аналгезия посредством рецептори, фармакологично различни от традиционните опиоидни рецептори (Rossi et al., 1997), тъй като ефектите му не се променят от блокера на опиоидните рецептори налоксон (Meunier et al., 1995; Reinshield et al., 1995).

В литературата се срещат автори, които наблюдават разлики в афинитета на свързване на ноцицептиновия рецептор с лигандите му, при различни типове клетки или биологични видове (Dooley and Houghten, 2000). Някои от тях предполагат, че различието в отговорите би могло да се дължи на съществуването на NOP-рецепторна хетерогенност (Mathis et al., 1997; Chiou, 2001). В литературата, обаче, не се намират убедителни данни за наличието на такава. Окончателни и категорични доказателства в подкрепа на тази хипотеза до момента не са известни. За охарактеризиране на евентуално съществуващи субтипове на NOP-рецептора е необходимо първо откриването и разработването на негови селективни лиганди, особено антагонисти (Corbett et al., 2006).

#### **1.4. РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА NOP-РЕЦЕПТОРА И ПО-ВАЖНИ БИОЛОГИЧНИ ЕФЕКТИ НА НОЦИЦЕПТИНА**

NOP-рецепторите са открити в симпатикови, парасимпатикови и сетивни неврони (Giuliani and Maggi, 1997; Bigoni et al., 1999b; Patel et al., 1997). Многобройни изследвания са установили наличието на различаващи се количества ноцицептин в различни мозъчни структури, което добре корелира с гъстотата на рецепторите му. Обобщено автордиографично изследване показва, че наличието



на N/OFQ и NOP е най-голямо в кортекс и намалява в по-дълбоките структури (Letchworth et al., 2000).

NOP-рецепторите са широко разпространени както в централната нервна система (Fukuda et al., 1994; Nothacker et al., 1996; Neal et al., 1999a), така също и в периферната нервна система (O'Donnell et al., 2001). Имунохистохимично са доказани в мозък на плъх и мишка (Anton et al., 1996; Ikeda et al., 1998; Monteillet-Agius et al., 1998; Neal et al., 1999a). NOP-рецептори са разположени в различни структури на мозъка: *cortex* (Bunzow et al., 1994; Lachowicz et al., 1995; Peluso et al., 1998; Neal et al., 1999a; Neal et al., 1999b), *amygdala* (Mollereau et al., 1994; Lachowicz et al., 1995; Meis and Pape, 1998; Neal et al., 1999a; Neal et al., 1999b), *hippocampus* (Mollereau et al., 1994; Neal et al., 1999a; Neal et al., 1999b; Amano et al., 2000), *septum* (Mollereau et al., 1994; Neal et al., 1999a; Neal et al., 1999b; Houtani et al., 2000), *habenula* (Bunzow et al., 1994; Mollereau et al., 1994; Neal et al., 1999b), *hypothalamus* (Lachowicz et al., 1995; Emmerson and Miller, 1999; Neal et al., 1999a; Neal et al., 1999b; Houtani et al., 2000), *ventral tegmentum* (Anton et al., 1996; Darland et al., 1998; Henderson and Mcknight, 1997; Neal et al., 1999a; Neal et al., 1999b; Norton et al., 2002), *locus coeruleus* (Bunzow et al., 1994; Connor et al., 1996; Neal et al., 1999a; Neal et al., 1999b), *raphe complex* (Bunzow et al., 1994; Lachowicz et al., 1995; Vaughan and Christie, 1996; Neal et al., 1999a), *periaqueductal grey* (Vaughan et al., 1997), *substantia nigra* (; Neal et al., 1999b), както и в гръбначен мозък (Bunzow et al., 1994; Riedl et al., 1996; Houtani et al., 2000).

NOP-рецепторите се експресират в редица периферни органи и системи - дихателната система (Fisher et al., 1998), сърдечно-съдовата система (Malinowska et al., 2002; McDonald et al., 2010), отделителната система (Kapusta, 2000), имунната система и периферните ганглии (Kummer and Fischer, 1997; Mollereau and Moulerous, 2000), гастроинтестиналният тракт (O'Donnell et al., 2001) и др.

Въз основа на хистологичните данни за широкото разпределение на NOP-рецепторите в организма, естествено се налага предположението, че N/OFQ/NOP системата има собствена физиологична роля и участва в регулацията на голям брой от основни физиологични процеси (Narayanan and Maidment, 1999; Neal et al., 1999a; Neal et al., 1999b), които включват: възприемане и предаване на болката (Meunier et

al., 1995; Reinscheid et al., 1995); обучение и запаметяване (Sandin et al., 1997; Yu et al., 1997; Calò et al., 2000a; Mogil and Pasternak 2001; Dzhambazova et al., 2008); внимание и емоции (Mollereau et al., 1994); адаптиране в отговор на безпокойство и стрес (Jenck et al., 1997; Neal et al., 1999a); мускулен тонус и движение (Neal et al., 1999a), терморегулация (Yakimova and Pierau, 1999); дишане (Peiser et al., 2000); контрол на апетита (Pomonis et al., 1996; Leventhal et al., 1998; Polidori et al., 2000); централна и периферна регулация на сърдечно-съдовата дейност (Giuliani et al., 1997; Chu et al., 1998; Armstead, 1999; Maslov et al., 1999; Salis et al., 2000), бъбречната функция (Karusta, 2000), гастроинтестиналният мотилитет (Osinski and Brown, 2000), възпалителните процеси (Kimura et al., 2000; Fiset et al., 2003) и имунитета (Du et al., 1998; Peluso et al., 1998; Serrano-Gomez et al., 2011) и др. В литературата се съобщават данни, че N/OFQ е способен да модулира хипоталамо-хипофизната ос, съответно и - репродуктивното поведение (Champion et al., 1997; Sinchak et al., 1997). Предполага се, че N/OFQ/NOP системата играе немаловажна роля и в контрола на агресията (Neal et al., 1999a), и системите за подкрепление и възнаграждение (Murphy et al., 1996; Murphy and Maidment, 1999; Di Giannuario et al., 1999; Di Giannuario and Pieretti, 2000). Не всички механизми, по които N/OFQ повлиява изброените функции и процеси, са достатъчно добре проучени.

През последните години, все по-широко се дискутира патологичната роля на ноцицептиновата пептидергична система за възникването на различни заболявания. Голяма част от нарастващия брой изследвания се насочват именно в тази посока.

#### **1.4.1. Ефекти върху болката**

Тъй като една от най-добре изучените функционални роли на опиоидергичната система е контролът на ноцецепцията, а и вземайки предвид факта, че активирането на NOP-рецепторите от N/OFQ води до G-алфа(i)-куплиране с трансдукционни механизми подобни на тези на опиоидите рецептори, логично се очаква N/OFQ да повлиява болката подобно на ендогенните опиоиди. Ето защо, първоначално голямо внимание се обръща именно на ефектите на N/OFQ върху болковите механизми. Многобройни са данните за участието на N/OFQ в

медирането и модулирането на болката в централни, гръбначомозъчни и периферни отдели на нервната система. Въпреки че ноцицептинът и опиоидните пептиди имат много сходно, припокриващо се разпределение в мозъчните структури, те не са колокализирани (Houtani et al., 1996; Schulz et al., 1996). В редица случаи, N/OFQ/NOP системата действа като функционален антагонист на опиоидергичната система (Mogil et al., 1996). Например, въведен интарцеребровентрикуларно (i.c.v.), ноцицептинът силно снижава болковия праг – т.е., оказва проноцицептивен, хипералгезичен или проалодиничен ефект (Meunier et al., 1995; Reinsheid et al., 1995) и проявява антиопиоидно действие (намалява аналгетичното действие на опиоидите) (Mogil et al., 1996; Wang et al., 1999; Yamamoto et al., 1999). Последният факт предизвиква значителен интерес, с оглед на възможното участие на N/OFQ/NOP системата в развитието на толеранс и зависимост към опиоиди, за което някои автори (Rothman, 1992; Ueda et al., 1997) допускат, че е пряко свързано с отделянето на антиопиоидни субстанции в организма. Наблюдаваният по-късно от Ueda (2000) и Rizzi (2000) намален морфинов толеранс у морфинозависими мишки при третиране с NOP-рецепторни антагонисти, както и потискането на синдрома на отнемане, предизвикано от инжектиране на налоксон (Ueda, 2000; Kest et al, 2001), са в подкрепа на хипотезата, че ноцицептиновата система е функционален антагонист на опиоидергичната.

Ефектите на N/OFQ включват регулация на освобождаването на редица невротрансмитери както в централната, така и в периферната нервна система (в това число на глутамат, ацетилхолин, норадреналин, допамин,  $\gamma$ -аминомаслена киселина и тахикинини - Nicol et al., 1996; Neal et al., 1997; Murphy et al., 1996; Patel et al., 1997; Bigoni et al., 1999b; Moran et al., 2000; Schlicker and Morari, 2000; Giuliani et al., 2000; Rominger et al., 2002; Zheng et al., 2002; Marti et al., 2003; Lambert, 2008) и някои хормони. Упражнявайки пресинаптична инхибиторна (модулаторна) функция, N/OFQ/NOP пептидергичната система блокира еуфоричните ефекти на морфин, етанол и психостимуланти като амфетамин, но приложеният самостоятелно N/OFQ няма подобен ефект (Kotlińska and Rafalski, 2004). Резултатите от всички тези изследвания предоставят нови насоки за разработване на алтернативни терапии за лечение на зависимост към опиоиди.

Интересни и двустранни са ефектите на N/OFQ върху ноцецепцията в периферията. При интратекално (i.t.) въвеждане, във високи дози ноцицептин проявява антиноцицептивен ефект (Xu et al., 1996; Wang et al., 1999; Yamamoto et al., 1999), докато в ниски дози той оказва проноцицептивно действие (Okuda-Ashitaka, 1996; Ito et al., 2001). Антиопиоидно или опиоидоподобно действие на N/OFQ, в зависимост и нивото на активиране (от дозите) на N/OFQ/NOP системата, описват и други автори (Zeilhofer and Calò, 2003; Marini et al., 2012a). На препарати от илеум на морско свинче, Marini и сътр. (2012) доказват, че N/OFQ/NOP системата директно регулира острия синдром на отнемане, предизвикан при тетиране с  $\mu$ -агонисти. Те за първи път съобщават, че в ентеричната нервна система при сегменти от илеум на морско свинче, ноцицептиновата система има постоянен тонус, т.е. тя е постоянно действаща пептидергична система, отделна от опиоидната (Marini et al., 2012b).

#### **1.4.2. Ефекти върху обучение и запаметяване**

Хипокампът е интегративната структура за конгнитивни функции, която притежава голяма гъстота на NOP-рецептори. Установено е, че N/OFQ понижава пространственото изследване и изследователското поведение след микроинжектиране в хипокамп у плъхове (Sandin et al., 1997). В подкрепа на това е повишаването на пространственото внимание при NOP-“knockout” мишки (Mamiya et al., 1998). Вероятно, използването на антагонисти за NOP-рецепторите биха могли да бъдат ефективни при паметов дефицит.

#### **1.4.3. Ефекти върху локомоцията и мотивацията**

Въведен i.c.v. у мишки, в доза 10 nmol (~18  $\mu$ g/мишка), ноцицептинът намалява хоризонталната и вертикалната активност, а също и мускулния тонус при мишки. Индуцира атаксия и загуба на “righting” рефлекса при 60% от животните (Reinscheid et al., 1995). Противоположни ефекти – увеличаване на хоризонталната и вертикалната локомоторна активност, както и активиране на изследователското поведение, е наблюдавано след i.c.v. въвеждане в дози 10 – 100 ng/мишка (Florin et

al., 1996). При плъхове, ноцицептинът не повлиява мотивацията (Devine et al., 1996).

#### **1.4.4. Ефекти върху апетита**

Високата плътност на NOP-рецептори и N/OFQ в контролиращите апетита области на хипоталамуса предполага, че той може да действа и като ендогенен орексигенен пептид. Установява се, че въведен интравентрикуларно посредством канюла у нахранени животни, N/OFQ индуцира значително повишение на приема на храна през първия час след инжектирането (Pomoniis et al., 1996). Подобен ефект се наблюдава и след въвеждане в nucleus accumbens или в хипоталамичната вентромедиална област (Stratford, et al., 1997).

#### **1.4.5. Ефекти върху невроендокринните функции**

Съществуват ограничен брой изследвания, относно способността на N/OFQ да модулира хипоталамо-хипофизната ос, откъдето и репродуктивното поведение.

Чрез “voltage clamp” техника е установено, че N/OFQ инхибира възбудимостта и спонтанното изпразване (~45%) на хипоталамични неврони, съдържащи хормони (окситоцин и вазопресин). Според авторите, действието на N/OFQ е медирано чрез постсинапсни NOP-рецептори (Doi et al., 1998).

#### **1.4.6. Ефекти върху гладки мускули**

Установно е, че някои висцерални гладки мускули и тъкани са чувствителни към действието на N/OFQ, в зависимост от органа или видовете характеристики. Високата им чувствителност се определя от наличието на пресинапсни хетерорецептори, сред които и NOP (Calò et al., 1996; Nicholson et al., 1996; Nicholson et al., 1998). Поради това ноцицептинът не променя тонуса на *vas deferens* от мишка, плъх и заек или илеум от морско свинче, но концентрация зависимо инхибира предизвиканите с електрическа стимулация съкращения на *vas deferens* от мишка и илеум на морско свинче между 50 - 98% (Calò et al., 1996; Zhang et al., 1997; Biggoni et al., 1999b;). По тази причина препаратите от *vas deferens* на мишка и плъх,

както и muscle anococcygeus (Ho et al., 2000) от плъх, са широко използвани в експерименталната практика, за определяне на активността на новосинтезирани агонисти и антагонисти на ноцицептина.

Противоположно, при колон от плъх, N/OFQ предизвиква концентрация зависими (ранни) тонични съкращения, последвани от бавни ритмични вълни и фазични съкращения при интравенозно въвеждане у анестезирани плъхове, подобно на действието на морфин (Taniguchi et al., 1998).

#### **1.4.7. Ефекти върху сърдечно-съдовата система**

*In vivo*, при интравенозно инжектиране у неанестезирани нормотензивни (както и при i.c.v. у анестезирани) плъхове, ноцицептин рязко понижава средното артериално налягане и забавя сърдечната честота (Chu et al., 1998; Madeddu et al., 1999; Malinovska et al., 2002). Най-общо, N/OFQ понижава тонуса на съдовите гладкомускулни клетки, разширява кръвоносните съдове и предизвиква концентрациязависима релаксация на изолирани пръстенчета от котешка бъбречна, мезентериална, каротидна и феморална артерия, съдържащи интактен ендотел (Gumusel et al., 1997).

#### **1.4.8. Ефекти върху дихателната система**

Особен интерес предизвикват ефектите на ноцицептина върху дихателната система и по-специално действието му при бронхоспазм. Изследвания проведени върху различни препарати от морско свинче, показват мощно потискане на електрически предизвиканото освобождаване на ацетилхолин от трахея (Patel et al., 1997), на тахикининергичните контракции на изолирани, електрически стимулирани бронхи (Fisher et al., 1998) и на предизвикания с капсаицин бронхоспазм на изолиран бял дроб (Corboz et al., 2000; Jia et al., 2002). В подобни експерименти проведени на препарати от трахея на плъх, ноцицептинът инхибира освобождаването на субстанция П (SP) и калцитонин ген-свързания пептид (calcitonin gene-related peptide - CGRP), (Peiser et al., 2000). Сходни резултати са получени и при изследване на невросенсибилизирани с  $\beta$ -агонисти (fenoterol)

изолирани човешки бронхи (Faisy et al., 2004). Обобщението на тези резултати показва, че ноцицептинът инхибира едновременно активността на холинергичните и на сетивните неврони в дихателната система.

#### **1.4.9. Ефекти върху отделителната система**

*In vivo* изследванията показват, че N/OFQ дозозависимо преходно потиска рефлекс за уриниране предизвикан от раздуване на пикочния мехур. Предполага се, че това действие се осъществява вероятно чрез потискане на трансмитерното освобождаване от постганглинните нервни терминали или чрез инхибиране на аферентните нерви на пикочния мехур (Guiliani et al., 1998). А също, ноцицептинът инхибира предизвиканите с електрическа стимулация неврогенни съкращения на пикочен мехур.

#### **1.4.10. Ефекти върху имунната система**

Напоследък много широко е изследвано участието на N/OFQ и NOP-рецептора в регулацията на имунитета (Halford et al., 1995). Наличието им в имунните клетки (периферни лимфоцити и спленоцити) подсказва за включването на N/OFQ/NOP системата в имунните реакции на организма (Wick et al., 1995). Налага се становището, че е ноцицептиновата пептидергична система осъществява функционална връзка между нервната и имунната система (Serrano-Gomez et al., 2011).

Впредвид широкото разпространение на N/OFQ в нервната система (Peluso et al., 1998), не е учудващо защо функционално ефектите на ноцицептина са толкова разнообразни и дори противоречиви. От многобройните изследвания проведени с различни тестове и различни начини на въвеждане, се оформя становището, че действията на N/OFQ/NOP системата зависят в голяма степен от различни фактори - генетични, такива на средата, от условията на изследването, дозата, от наличието на стрес, болка, зависимост към  $\mu$ -агонисти и др., и са по-скоро независими от тези на опиоидната система (Darland et al., 1998; Guerrini et al., 2000b).

Както споменахме по-горе, доказването на предположението за хетерогенност на NOP-рецептора, като вероятно обяснение на наблюдаваните вариации в ефектите на N/OFQ е затруднено, поради липсата на селективни NOP-рецепторни антагонисти (Corbett et al., 2006).

### **1.5. УЧАСТИЕ НА НОЦИЦЕПТИНА В ПРОЦЕСИТЕ НА ВЪЗПАЛЕНИЕ**

Локалното възпаление е патофизиологичен процес, който се характеризира с отделяне на проинфламаторни медиатори, увеличена пропускливост на кръвоносните съдове, неутрофилна екстравазация, оток и повишен метаболизъм на арахидоновата киселина. В развитието на възпалителния процес при животни и човек съществена роля играе стимулирането на немиелинизираните C- и миелинизираните A $\delta$ -сетиви неврвни влакна, които съдържат и освобождават различни неuropeптиди включително субстанция П и CGRP (Holzer et al., 1988; Kilo et al., 1997; Black, 2002). Сетивните неврони са компонент на неадренергичната, нехолинергична невромедиация (НАНХ) и осигуряват плътна инервация към повечето органи и тъкани, в частност към кръвоносни съдове, където периваскуларни нерви често завършват много близо до ендотелни клетки. Пресинаптично разположени върху тези нервни влакна рецептори могат да модулират освобождаването на неuropeптидите (Brain and Cox, 2006). Тези рецептори включват класическите опиодни и NOP-рецепторите, чувствителните към капсацин рецептори (transient receptor potential vanilloid-1 TRPV1), рецепторите за вазоактивния интестинален пептид (ВИП), канабиноиди, серотонин, хистамин (H<sub>3</sub>), гамааминомаслената киселина и др. (Maggi, 1991; Scoto et al., 2012). Тяхното значение при възпаление понастоящем не е ясно определено, но интензивно се изследва.

Известно е, че острото възпаление се повлиява добре от опиоиди (Maggi, 1991; Pourpak et al., 2004; Askari et al., 2008; Brock and Tonussi, 2008), което се дължи на способността им да инхибират освобождаването на медиатор от чувствителните към капсацин първични аферентни нервни терминали. Публикации на други автори показват, че N/OFQ (подобно на опиоидите) потиска невrogenното възпаление, като инхибира освобождаването на SP и CGRP от терминалите на

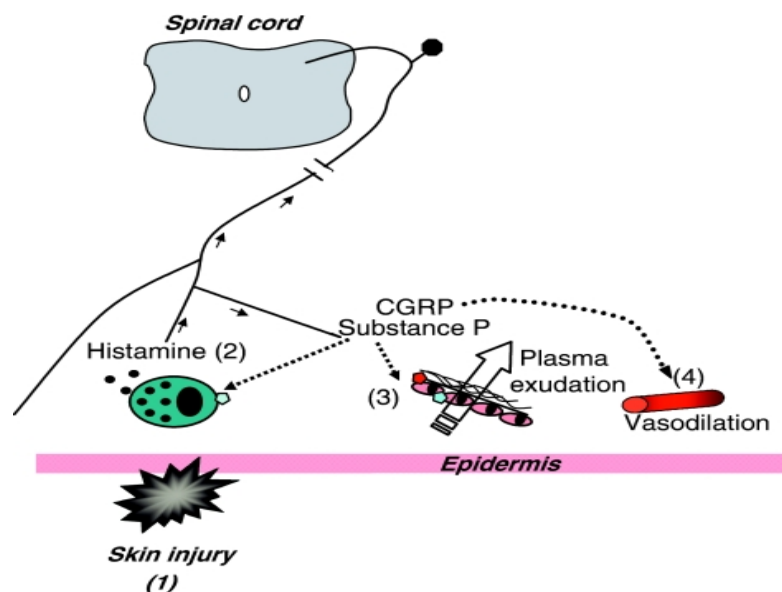


сетивните неврони (Giuliani and Maggi, 1997; Helyes et al., 1997), без да повлиява неневрогенната компонента. В потвърждение на това е и установеното от Inoue и сътрудници (1998), че във високи концентрации N/OFQ напълно блокира преизвикания от SP флексорен рефлекс.

Терминът неврогенно възпаление е въведен, за да опише факта, че антидромното стимулиране на кожните нерви води до вазодилатация и повишаване на пермеабилитета на кръвоносните съдове в областта около стимулирания нерв в резултат на освобождаване на вазоактивни пептиди (Lotz et al., 1988; Richardson and Vasko, 2002), а хроничното денервиране на кожата води до премахване на отговора към прилагане на дразнители върху повърхността ѝ (Lam and Ferrell, 1989; Kilo et al., 1997). Неврогенното възпаление не е ограничено само в кожата, а се наблюдава в различни вътрешни органи и структури като трахея, хранопровод, жлъчен мехур, черва, вагина, уретра и др. (Lam and Ferrell, 1989).

Механизмът на инхибиторното действие на N/OFQ върху първичните аферентни сетивни нервни влакна представлява интерес, поради възможното му използване за контрол и лечение на заболявания, свързани с възпалителни процеси (астма, артрит, колит, гастрит, миокардит, енцефалит и много други).

Базирайки се на получените данни от проведени експерименти върху оток на лапа на плъх, Németh и сътрудници (1998) стигат до заключението, че N/OFQ инхибира химически предизвиканото освобождаване на медиатори освен от чувствителните към капсацин аферентни сетивни неврони, също и от мастоцити. Противоположно на това, обаче, в литературата са докладвани и редица случаи, при които N/OFQ подпомага развитието на процеси, които могат да доведат до засилване на възпалителния отговор (Kato et al., 2005). Някои автори съобщават, че това е свързано със способността на N/OFQ дозозависимо да стимулира освобождаването на хистамин от мастоцити в кожа, перитонеум и мозък (Kimura et al., 2000; Tekes et al., 2006). При нарушаване на цялостта на кожата, освободеният от мастоцити хистамин действа като основен медиатор, активиращ сетивните неврони, посредством взаимодействие с H<sub>1</sub>-рецептори (Фиг. 5).



**Фиг. 5.** Схема, изобразяваща събитията, настъпващи след нараняване на кожата (Brain and Cox, 2006).

Последващото ортодромно (към гръбначния мозък) и антидромно стимулиране на заобикалящата нервите кожа води до освобождаване на неuropeптидите SP и CGRP. На свой ред, те могат допълнително да увеличават отделянето на хистамин или, действайки чрез NK1- и CGRP-рецептори върху ендотелни клетки на посткапилярите венули, да предизвикват увеличаване на кръвния поток и екстравазация на плазма на мястото на травмата (Brain and Cox, 2006). Следователно, в основата на дилататорния ефект на N/OFQ върху микроциркулаторните съдове в кожата е освобождаването на хистамин от мастоцити (Kimura et al., 2000), също и в мезентериум на плъх (Brookes et al., 2007).

При модел на остро възпаление на коляно, обаче, локално въведеният N/OFQ води до вторично освобождаване на проинфламаторни медиатори, активирайки NOP-рецептори, локализирани както върху синовиалните мастоцити, така и върху левкоцитите. Това допълнително стимулира отделянето на неuropeптиди от чувствителните към капсаicin сетиви неврони. Като резултат се повишава вазодилатацията и ставния кръвен поток (Zhang and McDougall, 2006). Интересно при тези изследвания е, че инактивирането (с fucoidin) на циркулиращите левкоцити напълно блокира предизвиканите от ноцицептина хиперемия и

вазодилатация. В същото време, стабилизирането на мастоцитните мембрани (с cromolyn) в много по-малка степен повлиява ефектите на N/OFQ. Хистаминът изглежда играе много по-малка роля в активирането на сетивните неврони в тъкани, различни от кожа, като видът на тъканта е най-значимият фактор, който определя ефектите на проинфламаторните медиатори (Maggi, 1991; Kilo et al., 1997). Затова и интересът как точно се активират тези нервни влакна *in vivo* е огромен. Например, при такива (*in vivo*) изследвания е установено, че някои имунни клетки, като левкоцитите (мононуклеарни и полиморфонуклеарни) не само експресират NOP-рецептори, но и са способни да синтезират N/OFQ, макар за имунологичната му роля да се знае малко (Peluso et al., 1998; Peluso et al., 2001; Fiset et al., 2003; Williams et al., 2006; Williams et al., 2007). Възможно е ноцицептинът да стимулира активирането и миграцията (хемотаксиса) на имунните клетки и да осъществява своето действие по паракринен механизъм, като левкоцитите го доставят до тъканите в мястото на възпалението (Serhan et al., 2001; Kato et al., 2005; Trombella et al., 2005). Секретираният от неутрофилите и лимфоцитите N/OFQ, в допълнение към влиянието му върху тяхната функция, вероятно стимулира също терминалите на сетивните неврони да експресират NOP-рецептори и да освобождават проинфламаторни фактори (Fiset et al., 2003; Scoto et al., 2012). В подкрепа на тази хипотеза са данните за повишаване на концентрацията на N/OFQ в кръвната плазма при критично болни пациенти със сепсис и в синовиалния флуид при пациенти болни от артрит, среда която типично съдържа голямо количество левкоцити (Fiset et al., 2003). Приетата за нормална плазмена концентрация на N/OFQ е в границите  $2.5 - 10.7 \text{ pg ml}^{-1}$  (Barnes et al., 2004). По-високи плазмачени концентрации на N/OFQ са установени при критично болни пациенти със сепсис (Williams et al., 2008). Промяна в плазмените нива на N/OFQ е установена също и при пациенти с различни болкови състояния и депресия (Chiou et al., 2007), карцином и цироза на черния дроб, болест на Wilson (Hantos et al., 2002; Spadaro et al., 2006; Doggrell, 2007).

Взети заедно, изложените резултати потвърждават съществуването на двупосочна комуникация между имунната и нервната система (Peluso et al., 2001; Fiset et al., 2003; Carvalho et al., 2008; Serrano-Gomez et al., 2011). Създаването на

специфични чисти антагонисти на ноцицептина (лишени от остатъчна агонистична активност) би допринесло за доказването на това допускане. Определянето на факторите, които биха могли да регулират както възбудимостта на сетивните неврони, така и активността на имунните клетки, и съответно да модулират комуникацията между двете системи, е от особено значение за създаване на нови подходи при лечение на заболявания с възпалителна и болкова компонента - мигрена, обструктивна пулмонална болест, възпаление на червата и др.

От друга страна, други проучвания показват, че N/OFQ намалява продукцията на хемокини и клетъчната пролиферация на имунни клетки. Например, Miller и Fulford (2007) съобщават, че пептидът потиска проинфламаторния цитокин интерлевкин 2 (IL-2) в спленоцити на плъх и така подпомага противовъзпалителния процес.

Обобщаването на данните води към предположението за съществуване на повече от един възможен механизъм на действие на N/OFQ, в зависимост от мястото на възпалителния процес, начина на въвеждане, вида на експресиращите NOP-рецептори клетки (нервни или имунни) и предизвикания отговор – инхибиране или стимулиране на отделянето на неврогенни или неврогенни медиатори на възпалението.

Известно е, че всеки възпалителен процес се съпътства от отделяне на голямо количество свободни радикали като резултат от действието на неутрофилни протеолитични ензими, необходими за разграждането на погълнатите патогени (Brown et al., 2006). Прекомерното и продължително образуване на свободни радикали води до настъпване на т.нар. оксидативен стрес (нарушаване на баланса между образуването на свободни радикали и активността на защитните антиоксидантни системи на организма). Съгласно Oyanagui (1980), супероксидният анион радикал  $O_2^-$  повлиява ключови компоненти от възпалителната каскада (Salvemini et al., 2001). Подобни данни за  $O_2^-$  и образуваните с негово участие пероксинитрит ( $NOOO^{\cdot}$ ) и хидроксилен радикал  $^{\cdot}OH$  са докладвани също от други автори при модел на остро, включително предизвикано с карагенан, възпаление (Oyanagui, 1980; Parola et al., 1981; Gentili et al., 1999; Salvemini et al., 2001; Cuzzocrea et al., 2001; Cuzzocrea et al., 2002; Khattab et al., 2006). Във връзка с това, интересни са

результатите на Rosenberger и сътр. (2001), които в астроцити наблюдават, че активните форми на кислорода значително повишават експресията на неврпептидният ген на проноцицептин. Индуцираната от оксидативния стрес експресия на този ген подсказва, че N/OFQ участва в отговорите на централната нервна система към невропатифизиологични увреждания, съпътствани от образуване на свободни радикали (Morini et al., 2005; Polidori et al., 2005).

Описаните в литературата факти демонстрират многостранното действие на N/OFQ при възпалителния процес. Очевидна е необходимостта от още проучвания за установяване на точния механизъм на действието му, а също и дали оксидативният стрес и е част от него.

Съществуват данни, че периферното възпаление води до повишена продукция на ноцицептин в първични сетивни неврони, съдържащи TRPV1-рецептори (Itoh et al., 2001). Подобно на ноцицептина, канабиноидите потискат острите възпалителни процеси в периферията, модулирайки активността на първичните сетивни неврони и намалявайки отделянето на SP и CGRP (Costa et al., 2004; Elmes et al., 2005; La Ranna et al., 2008). Предполага се, че тези ефекти на канабиноидите, или поне някои от тях, са резултат не само и не толкова от взаимодействието им със собствени рецептори, а се осъществяват и с участието на TRPV1-рецептора (Sagar et al., 2004). От друга страна, ноцицептинът инхибира ефектите на активираните TRPV1-рецептори при предизвикана с капсацин бронхоконстрикция в бял дроб от морско свинче при *in vivo* експерименти (Jia et al., 2002) и невросенситизация в изолирани човешки бронхи (Faisy et al., 2004). Също така, потиска предизвиканата с киселина кашлица (Lee et al., 2006) и намалява потенциала на TRPV1 при възпаление и болка (Chen et al., 2007). Съпоставянето на тези изследвания предполага възможна връзка в механизмите на действие на канабиноидите и ноцицептина при периферни възпалителни процеси, в които е вероятно участието на ванилоидните рецептори. За доказване на такава връзка и тук биха били полезни допълнителни проучвания.

## 1.6. ЗАВИСИМОСТ МЕЖДУ СТРУКТУРАТА НА НОЦИЦЕПТИНА И БИОЛОГИЧНАТА АКТИВНОСТ

Изясняването на физиологичната роля на N/OFQ/NOP системата, участието ѝ в патофизиологични процеси, както и прецизирането на механизмите на действие на N/OFQ е затруднено от липсата на специфични антагонисти. А създаването на специфични и високоактивни лиганди за NOP-рецептора е в тясна зависимост от идентифицирането на участъците от ноцицептиновата молекула, които са от решаващо значение за свързването с NOP-рецептора и за неговото активиране. Агонисти и антагонисти на NOP-рецептора могат да са от полза освен за нуждите на експерименталната фармакология, в по-далечна перспектива и в комбинираната терапия на различни заболявания като астма, повишена възбудимост, хипертония, анорексия, някои възпалителни процеси и др.

Аминокиселинната последователност на хептадекапептида N/OFQ е следната: Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Ala<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Ser<sup>10</sup>-Ala<sup>11</sup>-Arg<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-Ala<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Gln<sup>17</sup> (или FGGFTGARKSARKLANQ). Приема се, че пептидната верига на N/OFQ съдържа два функционално важни за взаимодействието с NOP-рецептора участъка. От решаващо значение за способността на ноцицептина да активира NOP-рецептора е N-крайната аминокиселинна последователност Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>– (мотива FGGF) или т.нар. „message domain” (Dooley and Houghten, 1996; Reinscheid et al., 1996; Butour et al., 1997; Guerinni et al., 1997). Този фрагмент е много подобен на N-крайния тетрапептид Tyr<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>– (YGGF), характерен и отговорен за активиране на опиоидите рецептори от ендогенните опиоидни пептиди. Разликата в първата аминокиселина на двата фрагмента - Tyr<sup>1</sup> (при опиоидите) и Phe<sup>1</sup> (при N/OFQ) обаче, е достатъчна ноцицептинът да не активира опиоидните рецептори (Guerrini et al., 2000b).

За селективното свързване на ноцицептина с NOP-рецептора са отговорни двете двойки базични аминокиселини Arg<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>, Arg<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup> или т. нар. „address domain” (Dooley et al., 1997; Rizzi et al., 2002). То се осъществява най-вероятно чрез взаимодействието на положително заредените странични вериги на посочените аминокиселини с отрицателно натоварени аминокиселинни остатъци в състава на

втората екстрацелуларна бримка на NOP-рецептора (Mollereau et al., 1999; Guerrini et al., 2000b). “Структура-активност” изследвания демонстрират, че Arg<sup>8</sup> е незаменима за рецепторното свързване и замествания в тази позиция дори с Lys обикновено водят до драстично понижаване на афинитета и активността (Dooley and Houghten, 1996; Salvadori et al., 1999). Заместването на Arg в дванадесета и Lys в девета и тринадесета позиции с Ala също довежда до инактивиране (Guerrini et al., 1997).

При изследване на различни по дължина фрагменти на N/OFQ, се установява, че дължината на пептидната верига е от значение за активността и афинитета. Guerrini и съавтори (1997) съобщават, че С-крайните аминокиселинни остатъци - Leu<sup>14</sup>-Ala<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Gln<sup>17</sup> не са съществени за рецепторното свързване и не цялата дължина на ноцицептиновата верига е необходима за пълната проява на биологичната активност. Обаче, Okada и сътр. (2000) доказват, че добавянето на две допълнителни базични аминокиселини в позиции 14 (Arg) и 15 (Lys) силно повишава афинитета към NOP-рецепторите на новополученото съединение. [Arg<sup>14</sup>,Lys<sup>15</sup>]N/OFQ е с по-продължително действие от N/OFQ при *in vitro* и *in vivo* изследвания - на изолирани органи и при i.c.v. въвеждане, респективно. При всички изолирани тъкани, [Arg<sup>14</sup>,Lys<sup>15</sup>]N/OFQ показва приблизително същия максимален ефект, като нативния N/OFQ, но има дори по-голям афинитет от него (Okada et al., 2000; Rizzi et al., 2002). Малко след това, Rizzi и съавтори (2002) при насочен синтез на негова основа получават конкуритивния селективен антагонист за NOP-рецептора [Nphe<sup>1</sup>,Arg<sup>14</sup>,Lys<sup>15</sup>]N/OFQNH<sub>2</sub>, с кодово име UPF-101 (Calò et al., 2002b).

Най-късият фрагмент, проявяващ пълната биологична активност на нативния N/OFQ с афинитет близък до неговия, е амидираният пептид N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (Guerrini et al., 1997; Bigoni et al., 1999b; Topham et al., 1998). Поради това, N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> широко се използва при изследвания вместо N/OFQ. По-късите фрагменти N/OFQ(1-12)NH<sub>2</sub> и N/OFQ(1-11)NH<sub>2</sub> са много слабо активни, изследвани върху гладкомускули препарати, докато най-късите (N/OFQ(1-9)NH<sub>2</sub> и N/OFQ(1-5)NH<sub>2</sub>) са напълно неактивни (Bigoni et al., 1999b).

Синтезирането на производни на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> представлява голям интерес, защото дава възможност за създаването на биологично активни

съединения, агонисти или антагонисти на NOP-рецепторите, които са устойчиви на енизмно разграждане.

Посредством „структура-активност” подхода са създадени няколко различни по афинитет и действие производни на N/OFQ, сред които неселективните съдържащи тирозин аналози [Tyr<sup>1</sup>]N/OFQ, [Tyr<sup>1</sup>]N/OFQNH<sub>2</sub> (Calò et al., 1997; Shimohigashi et al., 1996; Champion and Kadowitz, 1997a,b), [Tyr<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, [Tyr<sup>1</sup>]N/OFQ(1-9)NH<sub>2</sub> и [Tyr<sup>1</sup>]N/OFQ(1-5)NH<sub>2</sub> (Varani et al., 1999); [Phe<sup>1</sup>ψ(CH<sub>2</sub>NH)Gly<sup>2</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (или [F/G]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>), (Guerrini et al., 1998) - слабо активен агонист, който се държи като антагонист, парциален агонист или дори пълен агонист, в зависимост от използваните при изследванията обекти (Butour et al., 1998; Calò et al., 2000c; Mason et al., 2001) и [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> - първият селективен NOP-рецепторен антагонист (Calò et al., 2000b) и др.

[Tyr<sup>1</sup>]N/OFQ аналозите взаимодействат функционално както с NOP-, така и с класическите опиоидни рецептори. [Tyr<sup>1</sup>]N/OFQNH<sub>2</sub> и [Tyr<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> действат като смесени NOP/опиоидни агонисти с афинитет, съизмерим с този на N/OFQ. По-късоверижните аналози [Tyr<sup>1</sup>]N/OFQ(1-9)NH<sub>2</sub> и [Tyr<sup>1</sup>]N/OFQ(1-5)NH<sub>2</sub> проявяват слаба активност към опиоидните рецептори, но не и към NOP-рецепторите, тъй като ефектът им се премахва от налоксон (Shimohigashi et al., 1996; Calò et al., 1997; Varani et al., 1999). Резултатите от тези изследвания показват, че заместването на Phe<sup>1</sup> с Tyr в N/OFQ води до получаването на съединения, активиращи както NOP-рецептора (Butour et al., 1997; Varani et al., 1998), така и опиоидните μ- (Salvadori et al., 1997), и κ- (Reinscheid et al., 1998) рецептори.

Антагонистичната активност и промяната на афинитета, наблюдавани при [Phe<sup>1</sup>ψ(CH<sub>2</sub>NH)Gly<sup>2</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, вероятно се дължат на ограничаване на свободата на ротация на пептидната връзка Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-, в резултат от направената химична модификация - скъсяването ѝ при превръщането от -CONH- в псевдопептидна „Ψ” връзка -CH<sub>2</sub>NH- (Rizzi et al., 1999; Calò et al., 1998b; Calò et al., 2000b; Guerrini et al., 2000a).

Съединение с антагонистична активност [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, но и с нисък афинитет се получава и при увеличаване на разстоянието между Phe<sup>1</sup> и Phe<sup>4</sup> в



резултат от "изместването" на фениловия пръстен с един атом навън (Rizzi et al., 1999; Calò et al., 2000b).

Reinscheid и съавтори (1996) съобщават, че заместването на Phe<sup>4</sup> с Туг при [Tyr<sup>4</sup>]N/OFQ аналога също води до почти пълна загуба на активност, придружена и с драстично понижение на афинитета (с повече от 3 логаритмични единици) съобщават.

Bigoni и сътрудници (2002) изследват фармакологичната активност на серия аналози на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, при които водородният атом Phe<sup>4</sup> в пара позиция е заместен с F, NO<sub>2</sub>, CN, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, OH или NH<sub>2</sub>.

При изследвания върху рецепторното свързване, проведени на овариални клетки от хамстер CHO (Chinese hamster ovary cells), експресиращи рекомбинанти човешки NOP-рецептори (CHO<sub>hNOP</sub>) и мембрани от церебрален кортекс на плъх, [(pF)Phe<sup>4</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, [(pNO<sub>2</sub>)Phe<sup>4</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [(pCN)Phe<sup>4</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> показват по-висок афинитет от N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>. Афинитетът на [(pCl)Phe<sup>4</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> е съизмерим с този на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, докато за останалите съединения е по-нисък. При серии изследвания върху изолирани органи (илеум от морско свинче, колон от мишка и *vas deferens* от мишка или плъх), всички заместени съединения с изключение на [(pOH)Phe<sup>4</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> показват пълна агонистична активност със следния ред: pF = pNO<sub>2</sub> ≥ pCN ≥ N/OFQ = N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> = pCl ≥ pBr > pI = pCH<sub>3</sub> > pOH > pNH<sub>2</sub>. Селективността им към NOP-рецептора се запазва. Съединенията, получени в резултат на тези синтези, също са в подкрепа на критичното значение на Phe<sup>4</sup> за свързването и активирането на NOP-рецептора.

Синтезирането на NOP-рецепторни лиганди с висок афинитет, които не се подлагат на ензимно разграждане от ендогенните ензими в организма, дезактивиращи N/OFQ е основната цел на много изследвания. Във връзка с това възниква интересната идея за модифициране на структурата на биологично активни пептиди, чрез завъртане на страничната верига на определен аминокиселинен остатък посредством замяна на α-въглеродния атом на пептидната връзка с α-азотен атом. Полученият по такъв начин N-заместен глицин, например, не е хирален и се използва за синтез на пептидни деривати, наречени пептоиди или пептид-пептоид

хибриди, притежаващи протеолитична устойчивост и голяма гъвкавост (Simon et al., 1992). Гликозилирането на пептидите е друг обещаващ подход при насочения лекарствен дизайн и синтез на гликопептиди и неогликопептиди (Davies, 2002). Използвайки двата подхода, са синтезирани аналози на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, при които единият или и двата фенилаланинови остатъци (в позиции 1 и 4), аргининовите остатъци (в позиции 8 и 12) и аланиновите остатъци (в позиции 7 и 11) от пептидната верига са заместени с N-бензилглицин, N-(3-гванидинопропил)глицин и β-аланин. Получените съединения проявяват афинитет към опиоидните рецептори и показват аналгетична активност след подкожно приложение при мишки (Schweizer, 2002). Описани са и аналози на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, при които галактоза или N-ацетилгалактозамин са β-О-гликозидно свързани към Thr<sup>5</sup> и/или Ser<sup>10</sup> (Biondi et al., 2006).

Други “структура-активност” и ЯМР изследвания показват, че внедряването на α-спирална структура при заместването на Ala<sup>7</sup> и/или Ala<sup>11</sup> с аминоизобутирова киселина (Aib) повишава потентността на получените пептиди. На тази основа, Ardiun и сътрудници (2007) синтезират серия 20 производни на N/OFQNH<sub>2</sub>, при които остатъците на Ala в позиции 7 и 11 са заменени с Cα,α-дизаместени циклични, линейни и разклонени аминокиселини. Изследвани за биологична активност върху *vas deferens* от плъх, нито един от тези новосинтезирани аналози на N/OFQ не проявява по-добър ефект от [Aib<sup>7</sup>]N/OFQNH<sub>2</sub>. Интересно е да се отбелжи, че тези химични модификации, приложени върху модифицирани съединения с вече известна активност, водят до създаването на високо активните NOP-рецепторни лиганди [Nphe<sup>1</sup>Aib<sup>7</sup>Arg<sup>14</sup>Lys<sup>15</sup>]N/OFQNH<sub>2</sub> (UFP-111), [(pF)Phe<sup>4</sup>Aib<sup>7</sup>Arg<sup>14</sup>Lys<sup>15</sup>]N/OFQNH<sub>2</sub>, (UFP-112) и [Phe<sup>1</sup>W(CH<sub>2</sub>-NH)Gly<sup>2</sup>(pF)Phe<sup>4</sup>Aib<sup>7</sup>Arg<sup>14</sup>Lys<sup>15</sup>]N/OFQNH<sub>2</sub> (UFP-113). (UFP-112) и (UFP-113), които действат съответно като пълен и парциален агонист, а (UFP-111) показва антагонистична активност при *in vitro* изследвания.

Всички тези резултати потвърждават критичното значение не само на Phe<sup>1</sup> и Phe<sup>4</sup> от пептидната верига, но също така и на разстоянието между страничните вериги на аминокиселините им остатъци, за свързването и активирането на NOP-рецептора. Малките структурни промени във страничната верига на Phe<sup>1</sup>, при което

се променя пространствената ѝ ориентация, водят до получаване на съединения с антагонистична активност, за разлика от Phe<sup>4</sup>, където дори минимални промени водят до инактивиране. Следователно, Phe<sup>4</sup> изглежда е по-важна за NOP-рецепторното активиране, докато модификацията в молекулата на Phe<sup>1</sup> (наличието на ароматен фенилов остатък) променя типа активност от агонистична в антагонистична. (Butour et al., 1997).

В резултат от описаните „структура-активност“ зависимости се очертава схващането, че създаването на NOP-рецепторни лиганди би следвало да включва положително заредената аминокиселинна последователност от ноцицептиновата пептидна верига, а N-крайната секвенция от молекулата на N/OFQ е база за създаване на NOP-рецепторни агонисти или антагонисти.

Важно откритие на Dooley и съавтори (1997) е, че NOP-рецепторът се активира и от късоверижни пептиди, съставени от шест аминокиселини. Понататъшното скъсяване води до неактивни продукти. Чрез синтетна комбинаторна библиотека от повече от 52 милиона различни съединения те изолират и охарактеризират няколко хексапептида с висок афинитет към NOP-рецептора. Сред тях са Ac-RYYRWR-NH<sub>2</sub> (Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Arg-NH<sub>2</sub>), Ac-RYYRIK-NH<sub>2</sub> (Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Lys-NH<sub>2</sub>) и Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> (Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH<sub>2</sub>). Тези хексапептиди имат минимална структурна прилика с N/OFQ. Съдържат три положително заредени аминокиселинни остатъка, които определят способността им да взаимодействат с отрицателно заредения активен център на NOP-рецептора, като две от тях (Arg) са разположени във важните за взаимодействието с NOP-рецептора позиции 1 и 4 (Kawano et al., 2002). Установено е, че Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> и Ac-RYYRIK-NH<sub>2</sub> действат като парциални или пълни агонисти за NOP-рецептора при различни *in vivo* и *in vitro* системи (Dooley et al., 1997; Ambo et al., 2007). Сред тези хексапептиди, Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> е описан като най-активен и селективен парциален агонист за NOP-рецептора, без афинитет към  $\mu$ -,  $\kappa$ - или  $\delta$ - опиоидните рецептори (Mason et al., 2001; Carra' et al., 2005). Опити *in vivo* показват, че този пептид увеличава апетита у плъхове подобно на N/OFQ и имитира действието му в препарати от колон на мишка (Mason et al., 1998; Rizzi et al., 1999). За Ac-RYYRIK-NH<sub>2</sub> е установено, че инхибира напълно N/OFQ-предизвиканото

гуанозинтрифосфат- $\gamma$ -S свързване с NOP-рецептора в кортекс и сърце на плъх (Berger et al., 1999; Berger et al., 2000). Тези три хексапептида са една от най-използваните базисни матрици в „структура-активност” изследванията за създаване на нови биологично активни лиганди за NOP-рецептора.

Синтезирани са известен брой модифицирани при азотния край или с променено аминокиселинно съдържание производни на Ac-RYYRWR-NH<sub>2</sub>, от които pentanoyl-Ac-RYYRWR-NH<sub>2</sub> е показал много висок афинитет към NOP-рецептора, но много малка вътрешна активност (Judd et al., 2003; Judd et al., 2004).

От серия ацетилирани в N-края хексапептидни деривати на Ac-RYYRIK-NH<sub>2</sub>, аналогът Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-lysinoI (Ac-RYYRIK-oI с промяна на свободната карбоксилна група в хидроксилна) проявява слаба агонистична активност при различни *in vivo* и *in vitro* системи, но в повечето случаи действа като конкуритивен антагонист (Kocsis et al., 2004; Gündüz et al., 2006a).

Събраните данни предполагат, че и C- и N-краят от веригата на хексапептидите са важни за проявата на биологичната активност. Установено е, че всеки аргининов остатък от веригата е важен за запазване на пълния афинитет към NOP-рецептора и зместването на ацетиловата група, свързана с модифицирането на Arg<sup>1</sup> в N-края, с различни ацилни групи (пивалоилова, формилова, бензоилова, мезилова) понижава афинитета на лигандите. При модифициране на Tyr<sup>2</sup> и Tyr<sup>3</sup> се запазва афинитета към NOP-рецептора, но само ако поне един от двата остатъка запази хидроксилната си група (Judd et al., 2004). L-конфигурирана алифатна структура на странината верига на хексапептидите в пета позиция се свързва с потенциална антагонистична активност, докато нехирален остатък или такъв с D-конфигурация, водят до потенциална агонистична активност. За запазване на селективността, високия афинитет и агонистичната активност на дериватите на Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> е достатъчно наличието на фенилетилова структура в странична верига, а не цялото индолово ядро на Trp<sup>5</sup> (Carra' et al., 2005).

Изследването на “структура-активност” зависимостта на хексапептидните деривати предоставя базисна информация за минималните структурни изисквания за рецепторно свързване и активиране (Gündüz et al., 2006a,b).

В резултат от усилията на редица научни групи, досега са синтезирани освен различни пептидни производни на N/OFQ (Dooley and Houghten, 1999; Arduin et al., 2007; Guerrini et al., 2000a; Wu et al., 2002) и късоверижни NOP-активни пептиди (Dooley et al., 1997), също и някои непептидни съединения (агонисти - NNC 63-0532, Ro 64-6198, (+)-5a compound, W-212393, 3-(4-piperidinyl)indoles, 3-(4-piperidinyl) pyrrolo[2,3-b]pyridines; и антагонисти - TRK-820, J-113397, JTC-801, octahydrobenzimidazol-2-ones, 2-(1,2,4-oxadiazol-5-yl)-1 H-indole, N-benzyl-D-prolines, SB-612111), (Kawamoto et al., 1999; Bigoni et al., 2000; Jenck et al., 2000; Ozaki et al., 2000; Rizzi et al., 2001; Sugimoto et al., 2006; Chiou et al., 2007), но все още нито един лиганд не е показал достатъчна активност *in vivo*, за да намери практическо приложение (Chiou et al., 2007; Lambert, 2008).

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Направеният преглед и анализ на литературата показва, че въпреки голямото сходство в структурата на ноцицептина с опиоидните пептиди и в техните рецептори, този невропептид принадлежи към отделна, независима пептидергична система. Широкото ѝ разпределение в различни структури на централната и периферната нервна система обуславя разнообразието в медираните и/или модулирани от тази система фармакологични ефекти. Въпреки значителният брой изследвания през последните две десетилетия охарактеризиращи ноцицептина като регулатор на важни физиологични функции и процеси в организма, механизмите на действието му остават недостатъчно изяснени.

Резултатите от многобройни проучвания показват наличие на връзка между промените в нивата на ендогенните пептиди (в частност N/OFQ) и множество патологични процеси, протичащи в различни системи на организма – дихателна, сърдечно-съдова, гастроинтестинална, отделителна, имунна. Съществуват данни, че N/OFQ променя редица характеристики, свързани с възпалителния процес. Потиска неврогенното възпаление, без да повлиява неневрогенната компонента, инхибира отделянето на спазмогенните пептиди от сетивните неврони, участващи в хроничните възпалителни процеси в белия дроб, каквито са астмата и хроничните обструктивни пулмонални заболявания и др. Противоположно на това, пептидът в редица случаи има въздействия, които биха могли да доведат до обратния ефект – засилване на възпалителния процес, свързани със способността му да освобождава хистамин от мастоцити или да активира хемотаксиса на неутрофили и лимфоцити.

Въпреки многобройните изследвания, данните за ефектите на невропептида в процесите на възпаление и болка, които придружават редица заболявания (артрити, колити, гастрити, миокардити, енцефалити и много други), остават противоречиви. Няма достатъчна яснота за това, кои от ефектите на ноцицептина биха се проявили и по какъв механизъм той би могъл да повлияе периферното възпаление при опити върху цял организъм. Затова разработването на специфични, високоафинитетни NOP-рецепторни лиганди е от особено значение за по-задълбоченото и цялостно изследване на физиологичната и патофизиологичната

роля на N/OFQ/NOP-системата. Създаването на такива селективни NOP-рецепторни лиганди е в тясна зависимост от изучаването на химическата структура на активните центрове на пептидната молекула и нейния рецептор. Съществено значение за обогатяване на знанията ни относно структурните изисквания за свързване с NOP-рецептора и активирането му имат изследвания върху ролята на аминокиселините в ноцицептиновата верига и промените във фармакологичния ефект, до които водят малки структурни модификации в тях. Това би улеснило откриването при насочен лекарствен дизайн и синтез на нови, активни и стабилни молекули с пептидна природа, а оттам и създаването на потенциални лекарствени средства за различни заболявания на тяхна основа.

Обобщаването на тези данни ни даде основание да проведем скрининг изследванията върху зависимостта между биологичната активност и структурата на нови лиганди за NOP-рецептора, както и да проследим до каква степен се запазват установените върху съкратителната активност на гладки мускули ефекти и дали се променя техният характер на организмово ниво при експериментален модел на остро периферно възпаление. Получените данни ще позволят да се прецизира механизма на действие на ноцицептина при този патофизиологичен процес и ще обогатят знанията ни за биологичната роля и функциите на ноцицептиновата пептидергична система в него.

Цел на настоящата дисертация беше посредством *in vitro* и *in vivo* експериментални методики да се изследва биологичната активност и механизма на действие на 18 новосинтезирани лиганди за NOP-рецептора с различна дължина на пептидната верига, разделени в три серии:

- нови аналози на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, при които аминокиселини в ключови за активността позиции, са заместени с техни структурни аналози или модифицирани в N-края с {1-[(метоксифосфоно)метиламино]циклоалкан карбоксилни киселини} (CnAF)
- нови производни на хексапептида Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH<sub>2</sub> (Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>), модифицирани в N-края с CnAF

За изпълнение на тази цел си поставихме следните задачи:

1. При *in vitro* условия, да се установи как се променя биологичната активност на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> при:

- ◆ заместване на аминокиселините Lys<sup>9</sup> и/или Lys<sup>13</sup> с техните структурни аналози орнитин (Orn), диаминобутанова киселина (Dab) и диаминопропанова киселина (Dap)
- ◆ заместване на аминокиселината Phe<sup>1</sup> с CnAF, съдържащи 5-, 7- или 8- атомен циклоалканов пръстен
- ◆ внедряване на обемен цикличен заместител (CnAF) с различна големина (5-8 атома) към аминокиселината Phe<sup>1</sup>

2. При *in vitro* условия, да се проучи как се променя биологичната активност на NOP-активиращи хексапептиди при:

- ◆ заместване на аминокиселината Arg<sup>1</sup> с CnAF, съдържащи 5-, 7- или 8- атомен циклоалканов пръстен
- ◆ внедряване на цикличен заместител (CnAF) към аминокиселината Arg<sup>1</sup>

3. При *in vivo* условия, да се изследват ефектите на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и структурните му аналози [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> върху експериментален модел на предизвикано с λ-карагенан остро възпаление в задна лапа на плъх.

4. При *in vivo* условия, да се изясни предполагаемото участие на TRPV1-рецепторите в ефектите на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и структурния му аналог [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и връзката им с канабиноидната система върху експериментален модел на предизвикано с λ-карагенан остро възпаление в задна лапа на плъх.



### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Проведените при разработването на дисертационния труд опити най-общо могат да бъдат разделени на две групи - експерименти *in vitro* върху изолирани гладкомускулни органи и *in vivo* – върху интактни животни.

При фармакологичните експерименти са използвани мъжки, полово зрели плъхове от порода Wistar с тегло 180-200 g, отглеждани при 22-25 °C и редуващ се 12/12-часов цикъл “светло-тъмно”, при свободен достъп до вода и храна.

Всички експерименти са проведени съгласно “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” и правилата за работа с лабораторни животни на Етичната Комисия на Институт по невробиология на БАН.

#### 3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ПОСТАНОВКА ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ИЗОЛИРАНИ ОРГАНИ

Изолираните органи са относително опростена система, при която в значителна степен се елиминира влиянието на регулаторните механизми от страна на организма върху взаимодействието медиатор-рецептор. Поради това, класическата схема за проучване на гладкомускулната медиация и модулация в опити на изолирани препарати позволява да се изследва непосредственото взаимодействие на молекулите на екзогенно приложено съединение с рецептори в ефекторния орган.

Простатичната част от *vas deferens* на плъх е инервирана почти изцяло от адренергични неврони, притежаващи множество пресинапсно разположени хетерорецептори (Ziecher и Jaims, 1971; Wakade и Kirpekar, 1971), включително NOP-рецептори, посредством които N/OFQ може да модулира освобождаването на норадреналин (Calò et al., 1996; Nicholson et al., 1996; Nicholson et al., 1998). Това прави гладкомускулният препарат от *vas deferens* на плъх много подходящ обект за изследване на пресинапсни медиаторни взаимодействия в периферната нервна система и за целите на нашите изследвания, респективно.

### **3.1.1. Приготвяне на препарати от *vas deferens* на плъх**

След отваряне на коремната кухина, двата семепровода (*vas deferens*) се отделят от околните тъкани, без да се разтягат. Отпрепарираниите органи се поставят в петри с разтвор на Кребс, където внимателно се почистват от остатъци на съединителна тъкан и кръвоносни съдове. За целта на нашите опити се отделя простатичната част на *vas deferens* с дължина 12 - 15 mm. Гладкомускулните препарати се монтират в силиконизирани стъклени ванички за изолирани органи с двойни стени и вместимост 4 ml, които се пълнят с разтвор на Кребс, аериран с газова смес със състав 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. С помощта на термостат (U2) се поддържа постоянна температура на разтвора от 32.5 °C. Веки препарат се поставя в отделна ваничка по дължината на лонгитудиналните гладкомускулни слоеве, като единия му край се фиксира неподвижно, а другия се свързва с механоелектричен преобразувател за изометрично регистриране на гладкомускулни съкращения. За постигане на максимално близък до нормалното физиологично състояние тонус на гладките мускули, препаратите се обтягат с напрежение еквивалентно на тежест от 1 g и се оставят да се адаптират. Съкратителната активност на гладкомускулните препарати се регистрира и записва с онлайн система.

### **3.1.2. Метод на полева електрическа стимулация**

Методът на полева електрическа стимулация е широко използван във фармакологичната практика за имитиране на физиологичния нервен импулс. Стимулирането на изолираните органи с електрически импулси с определени характеристики предизвиква деполяризация на невронналната мембрана и отделяне на съответния ендогенен медиатор, последвано от бърз съкратителен отговор на изолирания гладкомускулен препарат. Импулсното поле се създава между два платинови електрода, поставени в органните ванички на разстояние 8 cm един от друг, а електрическата стимулация се подава от цифров стимулатор. Амплитудата на гладкомускулните съкращения, предизвикани с електрическа стимулация, може да се повлиява от действието на екзогенно въведени субстанции, посредством механизмите на пресинапсната модулация.

Модулиращото действие на N/OFQ се проявява в условията на нискочестотната електрическа стимулация (Low-Frequency Electrical Stimulation - LFES), която е подходяща за активиране на неврони и нервни терминали, без да се дразнят директно (неспецифично) гладкомускулните клетки. Параметрите на LFES, използвани в нашите опити с *vas deferens* на плъх, са следните: честота 0.05 Hz, 1 ms продължителност на импулса, през интервал от 20 s., супрамаксимален волтаж.

### 3.1.3. Фармакологичен анализ

За изследване на биологичната активност на новосинтезираните съединения върху съкратителните отговори на гладки мускули е използван методът на van Rossum и van der Brink (1963) за построяване на кумулативни “доза-отговор” криви. При този метод, изхождайки от основния принцип, че силата (степената) на ефекта е функция от дозата, в органната ваничка се въвеждат последователно повишаващи се концентрации от изследваното съединение без промиване на изолирания орган. Всяка следваща концентрация се въвежда след изчерпване на ефекта от предходната и това продължава до достигане на плато. Резултатите от експерименталните изследвания се представят графично чрез построяване на кривите “log на концентрацията-ефект” (или т. нар. “доза-отговор”). По абсцисната ос се нанасят в логаритмичен мащаб приложените моларни концентрации на изследваното съединение, а по ординатата – стойностите на предизвиканите от тях гладкомускулни отговори в проценти спрямо максималното съкращение (контролното, приравнено на 100%). Така получените криви имат S-образен вид и приблизително линеен характер в по-голямата си (средна) част. Освен за графичното представяне, този метод е удобен и за анализиране на ефектите на изпитваното вещество в зависимост от концентрацията, като дава възможност да се определят фармакологичните параметри  $E_{max}$  и  $pEC_{50}/pA_2$  за всяко от изследваните съединения.  $pEC_{50}$  дава информация за афинитета на даден агонист към рецепторите му и представлява отрицателен десетичен логаритъм на тази негова моларна концентрация, която предизвиква 50% от възможния максимален ефект. Максималният ефект ( $E_{max}$ ) предизвикан от най-високата приложена

концентрация на изпитваното съединение се изразява като процент на инхибиране на контролното (изходното) съкращение (при електрически стимулирани тъкани).

#### **3.1.4. Експериментален протокол на опитите *in vitro* върху гладкомускулни препарати**

За получаване на кумулативни “концентрация-отговор” криви по метода на van Rossum и van der Brink (1963) за всяко от изследваните съединения (освен в случаите на тахифилаксия) е прилаган следният експериментален протокол:

- адаптиране на гладкомускулни препарати от *vas deferens* на плъх за период от 30-60 мин. преди началото на опита, необходимо за получаване на стабилни, еднакви по амплитуда съкратителни отговори (като разтвора във ваничките се сменя на всеки 10-15 минути);
- в зависимост от серията изследвани съединения - въвеждане на последователно повишаващи се концентрации на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (контролна крива), промиване; или въвеждане на последователно повишаващи се концентрации на Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> (контролна крива), промиване;
- въвеждане на последователно повишаващи се концентрации от изследваното съединение, промиване;
- преинкубиране на препаратите с  $1 \cdot 10^{-6}$  M NaI за период от 10 мин. (без промиване) и въвеждане на последователно повишаващи се концентрации от изследваното съединение, промиване;
- преинкубиране на препаратите с  $3 \cdot 10^{-5}$  M NaIBzOH за период от 15 мин. (без промиване) и въвеждане на последователно повишаващи се концентрации от изследваното съединение.

Периодът на промиването на препаратите между прилагането на различните съединения обикновено продължава 30 мин. (като разтвора във ваничките се сменя на всеки 10-15 минути), достатъчни за пълното възстановяване на амплитудата на гладкомускулните съкращения до първоначалното ниво.

С всяко от изследваните съединения са провеждани най-малко 6 опита на отделни гладкомускулни препарати от *vas deferens* на плъх.

Nal в прилаганата от нас концентрация действа като антагонист за всички класически опиоидни рецептори  $\delta$ ,  $\kappa$ ,  $\mu$ , без да блокира NOP-рецептора (Calò et al., 2000). NalBzOH действа като конкуритивен антагонист както за класическите опиоидни рецептори, така и за NOP-рецептора (Nicolson et al. 1998; Bucher, 1998; Bigoni et al., 1999a; Chiou, 2001).

Концентрациите на антагонистите, както и интервалите им на действие са подбрани съобразно намерените в литературата данни за тяхната активност *in vitro*, приведени от Chiou (2001) и IUPHAR-DB.

Поради наблюдавана тахифилаксия при изследване на ефектите на третата серия N-модифицирани с CnAF производни на хексапептида Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH<sub>2</sub> (Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>), контролните и кумулативните “концентрация-отговор” криви в присъствие или отсъствие на Nal, или NalBzOH са получавани на отделни гладкомускулни препарати.

### 3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА ОСТРО ПЕРИФЕРНО ВЪЗПАЛЕНИЕ

Живият организъм е сложна саморегулираща се система, в която различни нервно-хуморални регулаторни механизми са от съществено значение за крайния ефект на фармакологично активните вещества. Затова е важно да се проследи, дали проявите биологична активност при *in vitro* условия изследвани съединения са ефективни и при прилагането им върху интактни животни. На организмово ниво, редица фактори могат да променят характера на ефекта или да доведат до липса на такъв, независимо от това, че е бил демонстриран в *in vitro* опити.

Много подходящ за целите на нашите изследвания е експерименталният модел на остро периферно възпаление предизвиквано с карагенан. Подкожното инжектиране на мукополизахарида карагенан в лапа на плъх или мишка предизвиква локално възпаление чрез масирано отделяне на проинфламаторни медиатори (цитокини, хистамин, брадикинин, простагландини), пептиди (SP, CGRP), азотен оксид и др. Затова е удобен и широко използван за изследване на противовъзпалителното действие на различни субстанции, включително лекарствени средства (Winter et al., 1962), както и за тестване на антиоксидантната активност на локални анестетици, флавоноиди и др. (Parola et al., 1981; Cuzzocrea et

al., 1999; Cuzzocrea et al., 2001; Bilici et al., 2002; Cuzzocrea et al., 2002; Leduc et al., 2002; Chou et al., 2003; Jang et al., 2005; Wu et al., 2006; Balamurugan, 2007; Halici et al., 2007; Lu et al., 2007; Nardi et al., 2007).

Периферното възпаление се предизвиква чрез интраплантарно (i.pl.) инжектиране на 0.1 ml 1% разтвор на  $\lambda$ -карагенан в задна дясна лапа на плъх. Локалният възпалителен процес се демонстрира от зачервяване, повишаване на температурата и оток в резултат от отделянето на неврогенни и неневрогенни медиатори на възпалението (Lam and Ferrell, 1989), последвано от повишена пропускливост на кръвоносните съдове и неутрофилна екстравазация, в мястото на приложение на CG. Тъй като увеличението на обема на лапата е времезависимо с максимум от третия до четвъртия час (Bilici et al., 2002; Costa et al., 2004), измерваният показател е промяната в обема на възпалената лапа в ml. Обемът се отчита с плетизмометър (Сн. 1) на всеки 30 или 60 мин. след инжектирането на карагенана, до края на четвъртия час (включително).



**Снимка 1.** Апарат плетизмометър за дигитално измерване на оток на лапа (Ugo Basile, Italy).

За контролен обем на лапата се приема измерената стойност преди инжектирането на карагенан. Получените след третирането стойности се сравняват с измерените контролни обеми. Промяната в обема на лапата се определя от разликата в двете стойности.

Изследвани при *in vivo* условия върху експериментален модел на остро периферно възпаление са съединенията N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и структурните му аналози [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, проявили най-голяма биологична активност *in vitro* върху гладки мускули.

Същият модел е използван и при втората серия експерименти, целящи да установят дали активирането на ванилоидните рецептори е общо звено в механизма на противовъзпалителното действие на ноцицептина, структурния му аналог [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и канабиноидите.

### **3.2.1. Експериментален протокол на опитите *in vivo* върху остро периферно възпаление - първа серия**

Изследванията за биологичните ефекти на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и структурните му аналози [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> са проведени по две експериментални схеми. При едната, изследваното съединение се въвежда 15 мин. преди CG, за да се проучи възможен протективен ефект, а при другата – изследваният пептид се въвежда едновременно с CG.

Преди всеки експеримент, опитните животни се маркират, претеглят и разделят в отделни групи, в зависимост от предстоящото третиране.

*Първи опит:*

1. Третирани с 0.1 ml/1% CG, въвеждан i.pl. (контролна група).
2. Третирани с 20 µg/kg N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан интраперитонеално (i.p.) едновременно с CG.
3. Третирани с 20 µg/kg N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. 15 мин. преди CG.

*Втори опит:*

1. Третирани с 0.1 ml/1% CG, въвеждан i.pl. (контролна група).
2. Третирани с 20 µg/kg [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. едновременно с CG.

3. Третиран с 20 µg/kg [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. 15 мин. преди CG.

*Трети опит:*

1. Третиран с 0.1 ml/1% CG, въвеждан i.pl. (контролна група).
2. Третиран с 20 µg/kg [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. едновременно с CG.

*Четвърти опит:*

1. Третиран с 0.1 ml/1% CG, въвеждан i.pl. (контролна група).
2. Третиран с 20 µg/kg [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. 15 мин. преди CG.

Всяка експериментална група се състои най-малко от 6 животни.

N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> са разтваряни във физиологичен разтвор и са инжектирани i.p. в обем 0.1 ml на 100 g тегло. Контролните групи са инжектирани със съответстващ обем физиологичен разтвор. Времеви интервали и използваните дози са съобразени с намерените в литературата данни за ноцицептина (Helyes et al., 1997).

### **3.2.2. Експериментален протокол на опитите *in vivo* върху остро периферно възпаление - втора серия**

Тази серия експерименти са проведени при тези условия, за които в предходната серия установихме, че N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> потискат възпалителния процес.

Преди всеки експеримент, опитните животни се маркират, претеглят и разделят в отделни групи, в зависимост от предстоящото третиране.

*Първи опит:*

1. Третиран с 0.1 ml/1% CG, въвеждан i.pl. (контролна група).
2. Третиран с 0.1 ml/1% CG и i.p. въвеждан диметил сулфоксид (DMSO) (втора контролна група).
3. Третиран с 0.4 mg/kg HU-210 (CB<sub>1</sub>-рецепторен агонист), въвеждан i.p. 60 мин. преди CG.
4. Третиран с 20 µg/kg N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. едновременно с CG.



5. Третирани с комбинация от 20 µg/kg N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. едновременно с CG и 0.4 mg/kg HU-210, въвеждан i.p. 60 мин. преди CG.

*Втори опит:*

1. Третирани с 0.1 ml/1% CG, въвеждан i.pl. (контролна група).
2. Третирани с 0.1 ml/1% CG и i.p. въвеждан DMSO (втора контролна група).
3. Третирани с 0.4 mg/kg HU-210, въвеждан i.p. 60 мин. преди CG.
4. Третирани с 20 µg/kg [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. 15 мин. преди CG.
5. Третирани с комбинация от 20 µg/kg [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. 15 мин. преди CG и 0.4 mg/kg HU-210, въвеждан i.p. 60 мин. преди CG.

*Трети опит:*

1. Третирани с 0.1 ml/1% CG, въвеждан i.pl. (контролна група).
2. Третирани с 0.1 ml/1% CG и i.p. въвеждан DMSO (втора контролна група).
3. Третирани с 1 mg/kg AM251 (CB<sub>1</sub>-рецепторен антагонист), въвеждан i.p. 60 мин. преди CG.
4. Третирани с 20 µg/kg N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. едновременно с CG.
5. Третирани с 20 µg/kg, [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. 15 мин. преди CG.
6. Третирани с 20 µg/kg N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. едновременно с CG и след предварително блокиране на CB<sub>1</sub>-рецепторите с 1 mg/kg AM251, въвеждан i.p. 60 мин. преди CG.
7. Третирани с 20 µg/kg [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. 15 мин. преди CG и след предварително блокиране на CB<sub>1</sub>-рецепторите с 1 mg/kg AM251, въвеждан i.p. 60 мин. преди CG.

*Четвърти опит:*

1. Третирани с 0.1 ml/1% CG и i.p. въвеждан DMSO (втора контролна група).
2. Третирани с 0.4 mg/kg HU-210, въвеждан i.p. 60 мин. преди CG.
3. Третирани с 0.4 mg/kg HU-210, въвеждан i.p. 60 мин. преди CG и след предварително блокиране на NOP-рецепторите с 1 mg/kg JTC-801, въвеждан i.p. 30 мин. преди HU-210.
4. Третирани с 1 mg/kg JTC-801 (NOP-рецепторен антагонист), въвеждан i.p. 60 мин. преди CG.

5. Третиран с 20 µg/kg N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. 15 мин. преди CG и след предварително блокиране на NOP-рецепторите с 1 mg/kg JTC-801, въвеждан i.p. 60 мин. преди CG.

*Пети опит:*

1. Третиран с 0.1 ml/1% CG и i.p. въвеждан DMSO (втора контролна група).
2. Третиран с 5 mg/kg AA-5-HT (N-arachidonyl-serotonin, TRPV1-рецепторен антагонист), въвеждан i.p. 60 мин. преди CG.
3. Третиран с 0.4 mg/kg HU-210, въвеждан i.p. 60 мин. преди CG.
4. Третиран с 0.4 mg/kg HU-210, въвеждан i.p. 60 мин. преди CG и след предварително блокиране на TRPV1-рецепторите (ванилоидните) с 5 mg/kg AA-5-HT, въвеждан i.p. 30 мин. преди HU-210.

*Шести опит:*

1. Третиран с 0.1 ml/1% CG, въвеждан i.pl. (контролна група).
2. Третиран с 5 mg/kg AA-5-HT, въвеждан i.p. 60 мин. преди CG.
3. Третиран с 20 µg/kg N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. едновременно с CG.
4. Третиран с 20 µg/kg, [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. 15 мин. преди CG.
5. Третиран с 20 µg/kg N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. едновременно с CG и след предварително блокиране на TRPV1-рецепторите с 5 mg/kg AA-5-HT, въвеждан i.p. 30 мин. преди N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>.
6. Третиран с 20 µg/kg, [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. 15 мин. преди CG и след предварително блокиране на TRPV1-рецепторите с 5 mg/kg AA-5-HT, въвеждан i.p. 30 мин. преди [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>.

Всяка експериментална група се състои най-малко от 6 животни.

Тъй като канабиноидните агонист и антагонист (HU-210, AM251), както и блокера на ноцицептиновите рецептори (JTC-801) се разтварят в DMSO, ефектите им са сравнявани с втората контролна група животни – третиран с CG и DMSO, а тези на разтваряните във физиологичен разтвор ноцицептинови производни - с другата третирана само с CG контролна група.

Дозите и времевите интервали на приложение на канабиноидните агонисти и антагонисти са в съответствие с намерените в литературата данни (Smith et al., 2000; Holt et al., 2005; Maione et al., 2007; Rawls et al., 2007).

### 3.3. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ

Получените резултати са обработени статистически с еднофакторен анализ ANOVA (с последващ Dunnett или Newman-Keuls пост-тест, според случая) или *t*-тест на Student. Експерименталните данни са представени като средни стойности със съответните им стандартни грешки ( $m \pm \text{S.E.M.}$ ). За статистически достоверни се приемат разликите, при които  $p \leq 0.05$ . При построяване на графиките е използван софтуерния продукт GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software, Inc., 1992, USA).

### 3.4. ИЗПОЛЗВАНИ ФАРМАКОЛОГИЧНИ СРЕДСТВА

В експерименталните процедури са използвани следните вещества и реагенти:

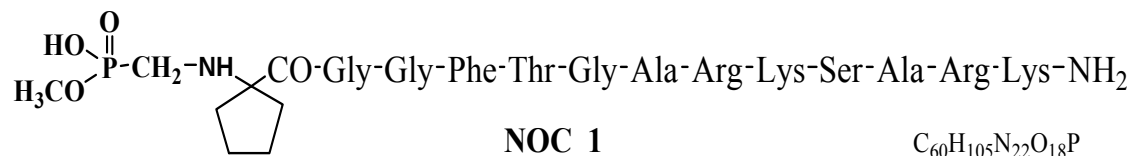
#### 3.4.1. Фармакологични субстанции:

- N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (Tocris)
- Naloxone hydrochloride (Tocris)
- Naloxone benzoylhydrazone (Tocris)
- $\lambda$ -carrageenan (SIGMA-ALDRICH)
- Amastatin, Streptomyces sp. (Merck)
- Bestatin (Merck)
- Phosphoramidon, Disodium salt (Merck)
- Captopril (Merck)
- HU-210 - CB<sub>1</sub>-рецепторен агонист (Tocris)
- AM251 - CB<sub>1</sub>-рецепторен антагонист (Tocris)
- JTC-801 - NOP-рецепторен антагонист (Tocris)
- AA-5-HT (Arachidonyl serotonin) - TRPV1-рецепторен (ванилоиден) антагонист (Tocris)
- WIN 55,212-2 - смесен CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>-рецепторен агонист (Tocris)

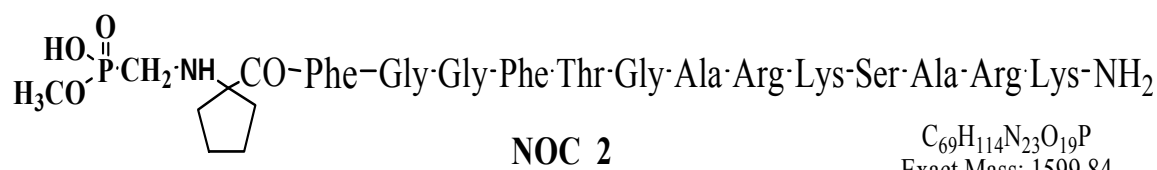
Съединения, синтезирани в Катедрата по органична химия на ХТМУ, София:

- N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>
- [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>
- [Orn<sup>13</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>

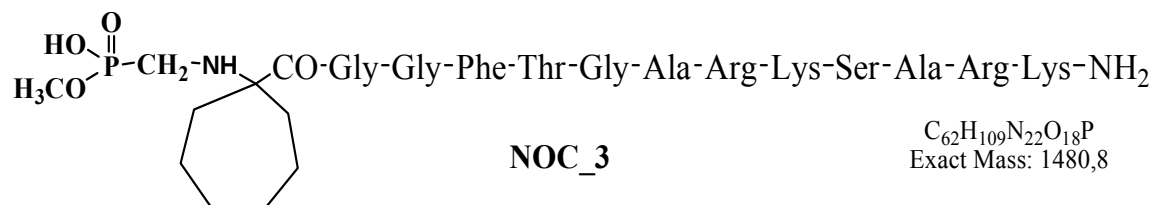
- [Orn<sup>9</sup>,Orn<sup>13</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>
- [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>
- [Dap<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>
- [Dab<sup>9</sup>,Dab<sup>13</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>
- [Dap<sup>9</sup>,Dap<sup>13</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>



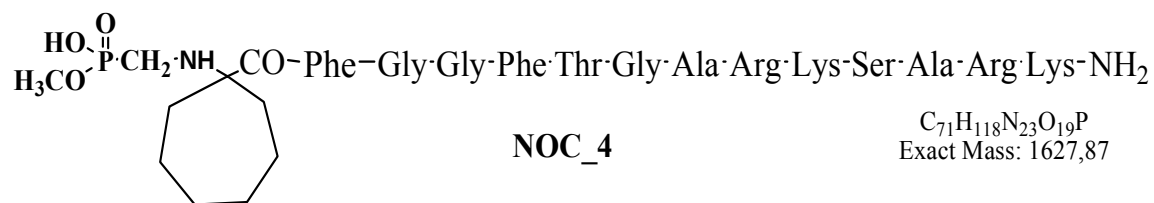
C<sub>60</sub>H<sub>105</sub>N<sub>22</sub>O<sub>18</sub>P  
Exact Mass: 1452,77



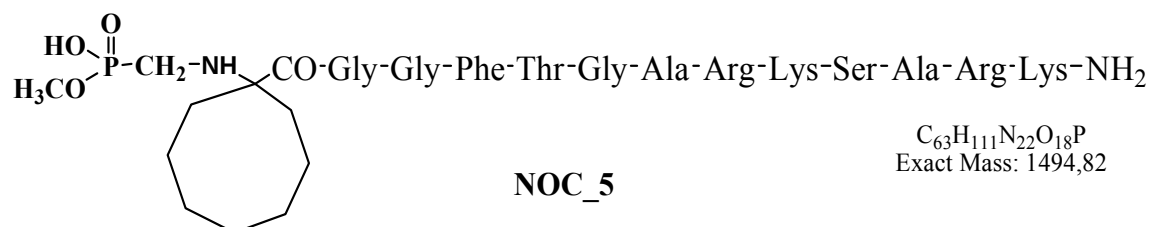
C<sub>69</sub>H<sub>114</sub>N<sub>23</sub>O<sub>19</sub>P  
Exact Mass: 1599,84



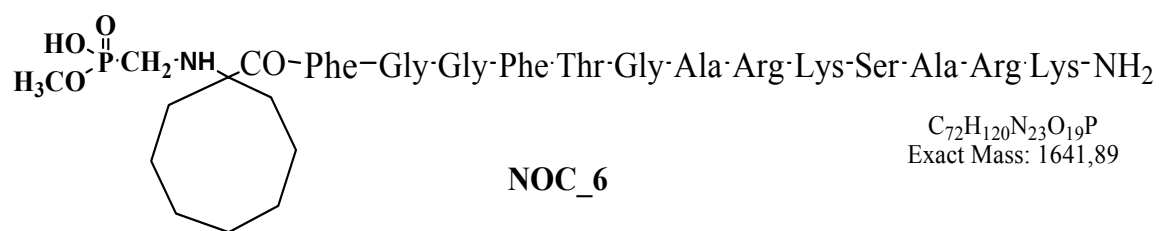
C<sub>62</sub>H<sub>109</sub>N<sub>22</sub>O<sub>18</sub>P  
Exact Mass: 1480,8



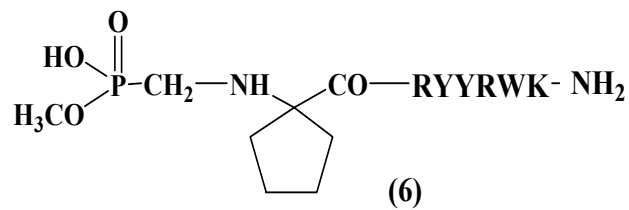
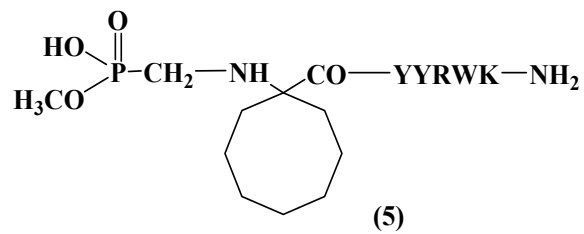
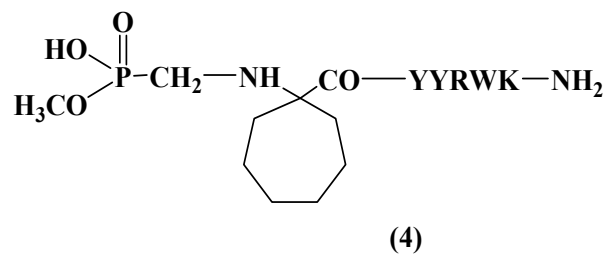
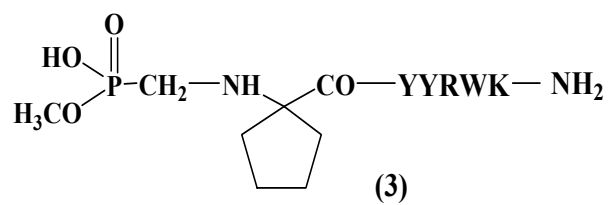
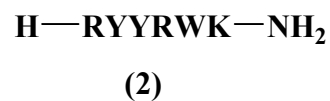
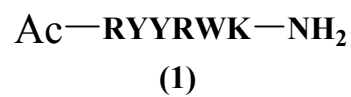
C<sub>71</sub>H<sub>118</sub>N<sub>23</sub>O<sub>19</sub>P  
Exact Mass: 1627,87



C<sub>63</sub>H<sub>111</sub>N<sub>22</sub>O<sub>18</sub>P  
Exact Mass: 1494,82



- Аналоги на Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>:



Съединение 1 е разтваряно в 0.05 М оцетна киселина.

Синтезът (твърдофазен по Fmoc - 9-флуоренилметилоксикарбонил стратегия) на съединенията е извършен в Катедрата по Органична химия на ХТМУ, София. Пептидите са пречистени чрез обратнофазова течна хроматография под високо налягане. Чистотата на съединенията, проверена чрез масспектрометрия, е между 97% и 99%.

#### **3.4.2. Разтвори и реагенти:**

- Дестилирана вода
- Физиологичен разтвор
- Разтвор на Кребс (mmol/l): NaCl – 113; KCl – 4.7; CaCl<sub>2</sub> – 2.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.2; MgSO<sub>4</sub> – 1.2; NaHCO<sub>3</sub> – 25; glucose – 11.5
- 0.05 М CH<sub>3</sub>COOH
- Dimethyl sulfoxide (SIGMA-ALDRICH)

Всички разтвори са съхранявани на студено, при съответните за всяко съединение изисквания.

## IV. РЕЗУЛТАТИ

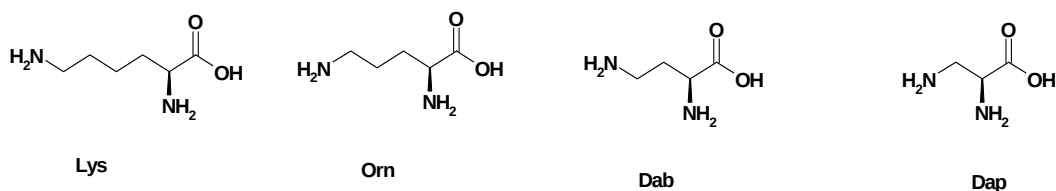
### 4.1. ЕКСПЕРИМЕНТИ *IN VITRO* ВЪРХУ ИЗОЛИРАНИ ГЛАДКОМУСКУЛНИ ПРЕПАРАТИ ОТ VAS DEFERENS НА ПЛЪХ, СТИМУЛИРАНИ С LFES

#### 4.1.1. Изследване на биологичната активност на серия нови производни на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> модифицирани в девета и/или тринадесета позиция от пептидната верига

Изследвана е биологичната активност на седем производни на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, модифицирани в девета и/или тринадесета позиция, чрез заместване на аминокиселината Lys със структурните ѝ аналози Orn, Dab или Dap:

1. H-Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Ala<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-**Orn**<sup>9</sup>-Ser<sup>10</sup>-Ala<sup>11</sup>-Arg<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>
2. H-Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Ala<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Ser<sup>10</sup>-Ala<sup>11</sup>-Arg<sup>12</sup>-**Orn**<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>
3. H-Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Ala<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-**Orn**<sup>9</sup>-Ser<sup>10</sup>-Ala<sup>11</sup>-Arg<sup>12</sup>-**Orn**<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>
4. H-Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Ala<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-**Dab**<sup>9</sup>-Ser<sup>10</sup>-Ala<sup>11</sup>-Arg<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>
5. H-Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Ala<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-**Dap**<sup>9</sup>-Ser<sup>10</sup>-Ala<sup>11</sup>-Arg<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>
6. H-Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Ala<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-**Dab**<sup>9</sup>-Ser<sup>10</sup>-Ala<sup>11</sup>-Arg<sup>12</sup>-**Dab**<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>
7. H-Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Ala<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-**Dap**<sup>9</sup>-Ser<sup>10</sup>-Ala<sup>11</sup>-Arg<sup>12</sup>-**Dap**<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Получените по този начин пептиди се различават помежду си само по дължината на аминокиселинния остатък в девета и/или тринадесета позиция:

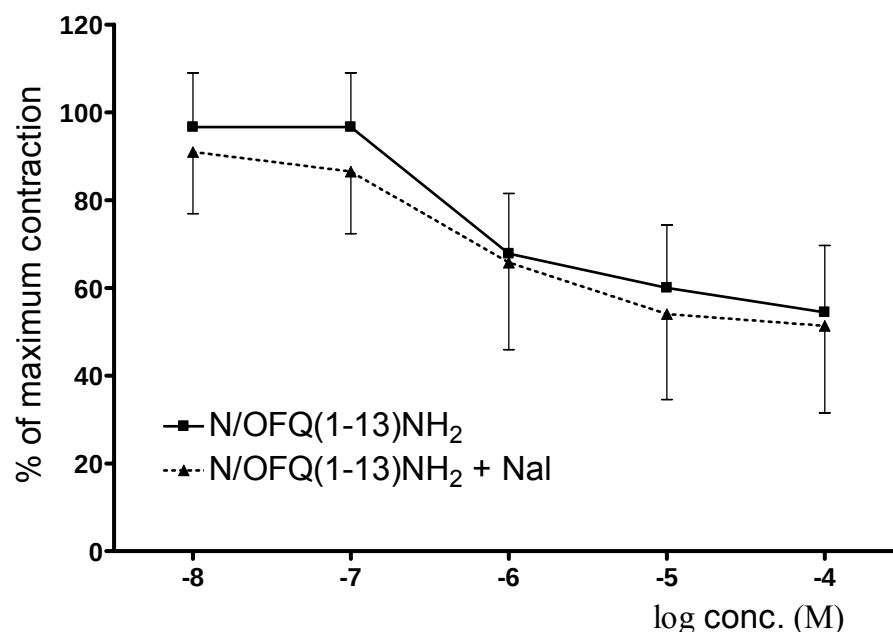


Една от нашите задачи беше да проследим как тези малки структурни разлики променят взаимодействието с активния център на NOP-рецептора и съответно биологичната активност.

В прилаганите от нас концентрации, новосинтезираните съединения не променят мускулния тонус на изолирани сегменти от *vas deferens* на плъх, но

потискат в различна степен съкратителните им отговори предизвикани с LFES. За да проверим дали наблюдаваните ефекти не се дължат на взаимодействие с класическите опиоидни рецептори, използвахме неселективния пълен опиоиден антагонист Nal ( $1.10^{-6}$  M), който практически не проявява афинитет към NOP-рецептора (съгласно Mollereau et al., 1994).

Биологичната активност на изследваните производни е сравнявана с тази на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, синтезиран в същата лаборатория и използван като референтен агонист. Резултатите от проведените с него експерименти са представени на Фиг. 6.



**Фиг. 6.** “Концентрация-отговор” крива на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан преди и след Nal, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.

N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> концентрация зависимо намалява амплитудата на предизвиканите с LFES гладкомускулни съкращения на *vas deferens* от плъх, в съответствие с литературните данни (Rizzi et al., 2001).

Информация за афинитета и ефективността на новосинтезираните пептидни аналози предоставят получените от кумулативните “концентрация-отговор” криви стойности за фармакологичните параметри pEC<sub>50</sub> и E<sub>max</sub>, представени в Табл. 2.

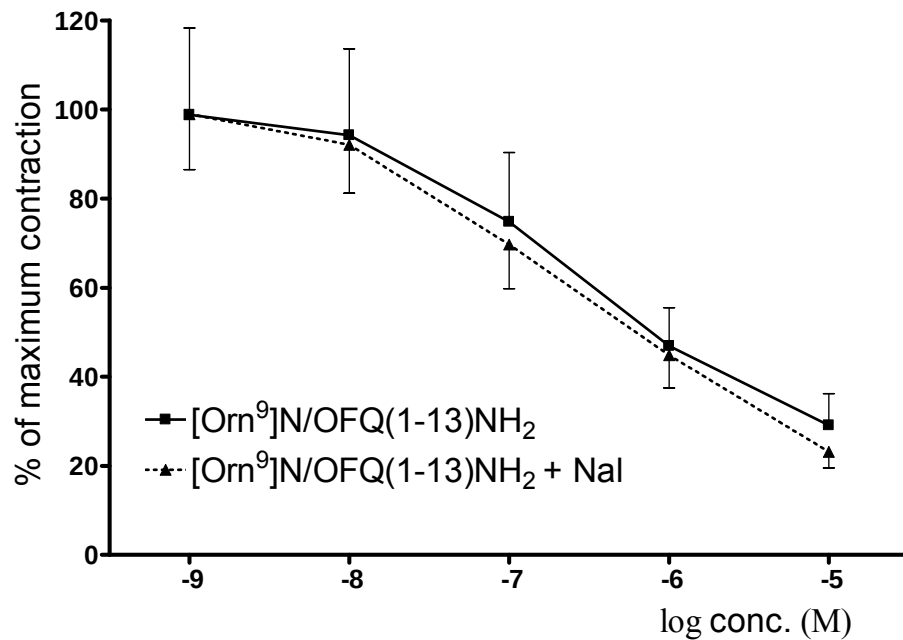


| ИЗСЛЕДВАН ПЕПТИД                                                 | ПЕПТИД            |                      | НАЛОКСОН + ПЕПТИД |                      |
|------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|                                                                  | pEC <sub>50</sub> | E <sub>max</sub> (%) | pEC <sub>50</sub> | E <sub>max</sub> (%) |
| N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub>                                       | 6.24±0.30         | -46±15               | 6.40±0.36         | -49±20               |
| [Orn <sup>9</sup> ]N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub>                    | 6.63±0.20         | -71±7                | 6.67±0.12         | -77±4                |
| [Orn <sup>13</sup> ]N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub>                   | 4.97±0.13         | -54±5                | 4.97±0.18         | -48±5                |
| [Orn <sup>9</sup> ,Orn <sup>13</sup> ]N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub> | 6.02±0.25         | -56±13               | 5.83±0.26         | -70±9                |
| [Dab <sup>9</sup> ]N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub>                    | 5.94±0.13         | -76±4                | 5.84±0.15         | -70±6                |
| [Dap <sup>9</sup> ]N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub>                    | 5.88±0.12         | -65±12               | 5.81±0.43         | -49±11               |
| [Dab <sup>9</sup> ,Dab <sup>13</sup> ]N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub> | 5.54±0.14         | -57±11               | 5.53±0.13         | -52±8                |
| [Dap <sup>9</sup> ,Dap <sup>13</sup> ]N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub> | 5.29±0.11         | -47±7                | 5.36±0.15         | -49±5                |

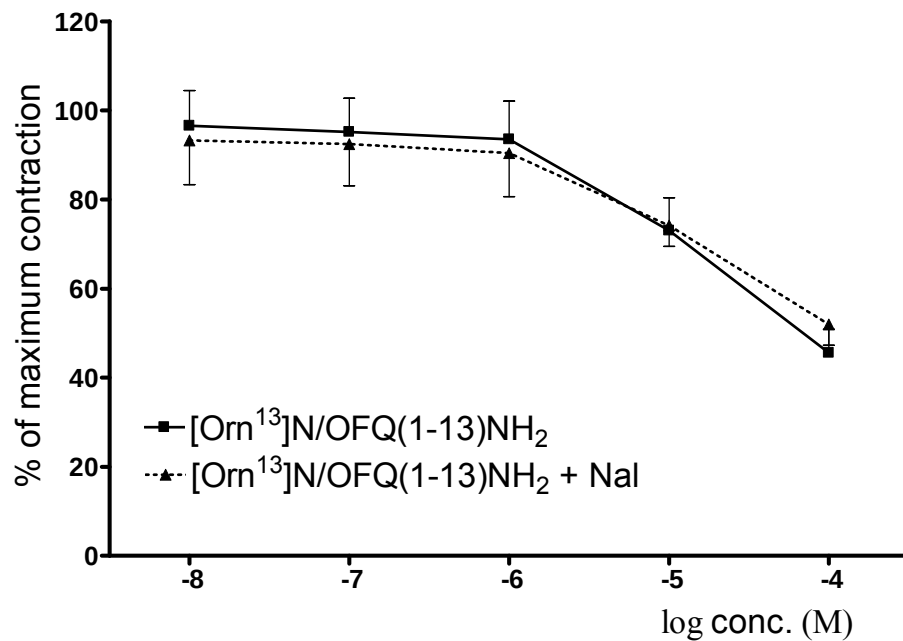
**Таблица 2.** Биологична активност на модифицираните в девета и/или тринадесета позиция пептидни аналози на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> върху предизвиканите с LFES гладкомускулни съкращения на *vas deferens* от плъх. Данните са представени като средни стойности ± SEM.

Сравняването на стойностите за pEC<sub>50</sub> и E<sub>max</sub> на различните съединения показват, че производното [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, получено след заместване на аминокиселината Lys в девета позиция с аминокиселината Orn проявява по-голяма агонистична активност от останалите аналози и по-голям максимален ефект (E<sub>max</sub> = -71%, pEC<sub>50</sub> = 6.63) в сравнение с референтния агонист (E<sub>max</sub> = -46%, pEC<sub>50</sub> = 6.24). От незначителната разлика в стойностите за pEC<sub>50</sub>, изчислени от кумулативните криви за [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> преди и след въвеждане на 1.10<sup>-6</sup> M NaI (Фиг. 7), се вижда, че инхибиторният му ефект се запазва непроменен и след предварително блокиране на опиоидните рецептори.

Заместването на Lys с Orn в другата важна за биологичната активност на молекулата позиция тринадесет, доведе до противоположна промяна. Полученото производно [Orn<sup>13</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> показва практически липса на активност (pEC<sub>50</sub> = 4.97) в сравнение с референтния N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (pEC<sub>50</sub> = 6.24) при ниските концентрации и намали амплитудата на гладкомускулните съкращения само в най-високите приложени концентрации (1.10<sup>-6</sup> M – 1.10<sup>-4</sup> M, Фиг. 8).

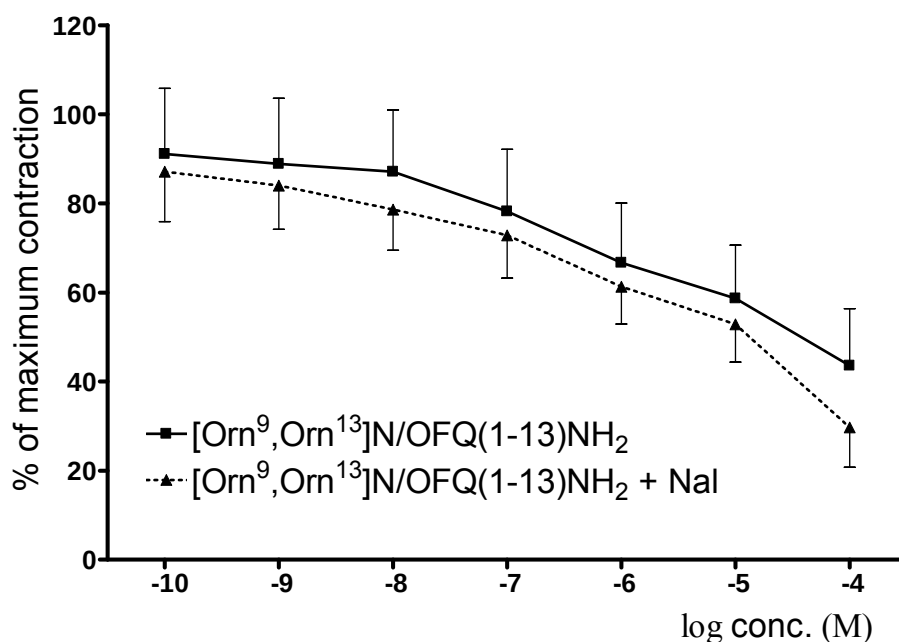


**Фиг. 7.** “Концентрация-отговор” крива на  $[\text{Orn}^9]\text{N/OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ , въвеждан преди и след Nal, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.



**Фиг. 8.** “Концентрация-отговор” крива на  $[\text{Orn}^{13}]\text{N/OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ , въвеждан преди и след Nal, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.

Едновременното заместване на Lys с Orn в двете позиции девет и тринадесет, доведе до понижаване (макар и малко по-слабо) на афинитета на полученото съединение -  $[\text{Orn}^9, \text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ , в сравнение с  $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$  и с  $\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ ; докато максималният му инхибиторен ефект е приблизително еднакъв с този на  $[\text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ , но по-малък от този на  $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$  (Фиг. 9). Интересен е фактът, че въпреки това  $[\text{Orn}^9, \text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$  понижава величината на гладкомускулните съкращения при концентрация ( $1 \cdot 10^{-10}$  M) по-ниска от тази на останалите съединения.



**Фиг. 9.** “Концентрация-отговор” крива на  $[\text{Orn}^9, \text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ , въвеждан преди и след Nal, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.

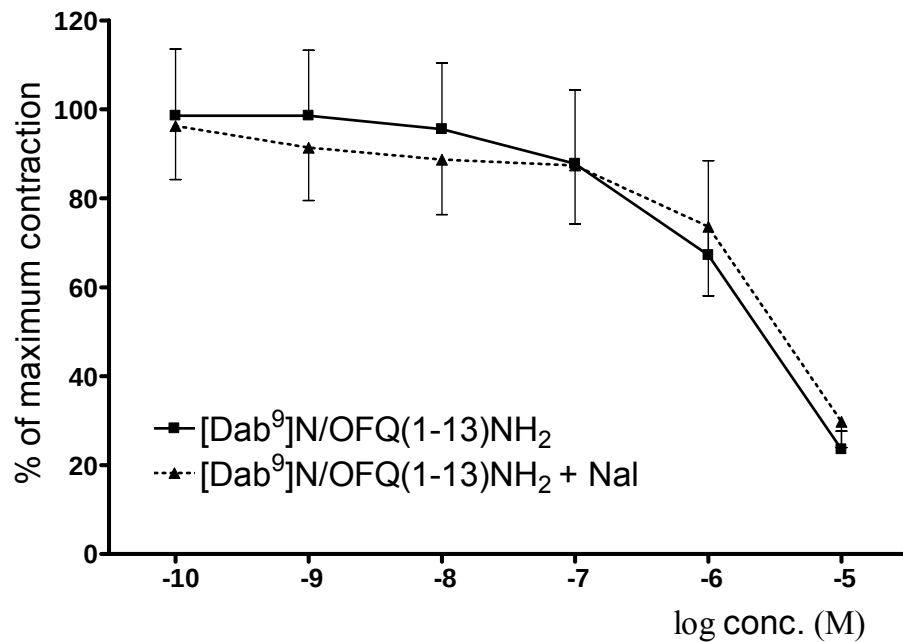
Подобно на  $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ , съединенията  $[\text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$  и  $[\text{Orn}^9, \text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$  също не показват съществени различия в кумулативните „концентрация-отговор” криви получени при самостоятелното им прилагане или след претретиране на сегментите от *vas deferens* с Nal ( $1 \cdot 10^{-6}$  M). Следователно, регистрираното потискане на гладкомускулните съкращения най-вероятно се дължи на селективно действие върху ноцицептиновия рецептор.

Тъй като Orn представлява структурен аналог на Lys, чиято молекула съдържа една метиленова ( $-\text{CH}_2$ ) група по-малко, от представените резултати можем да обобщим, че:

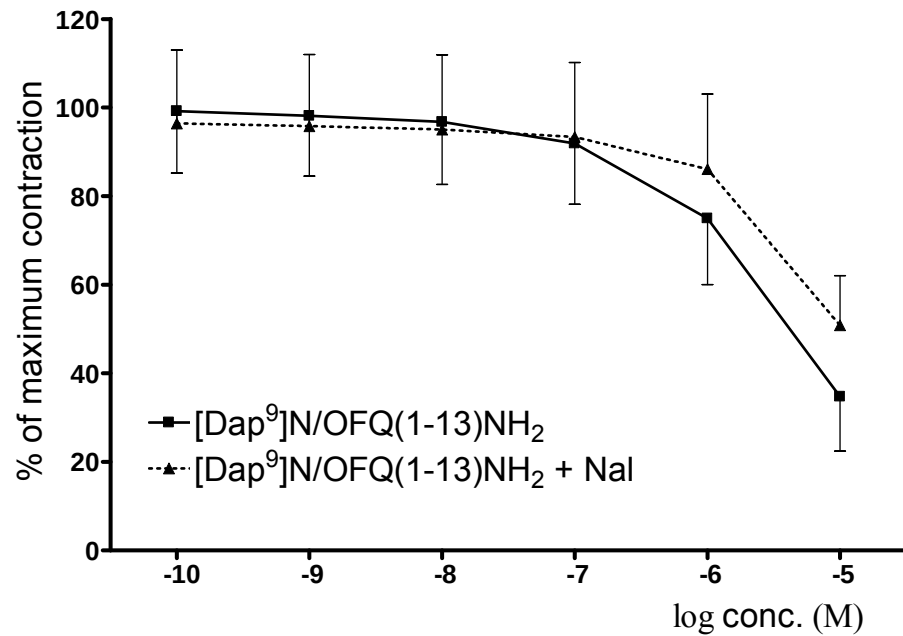
- скъсяването на страничната верига на Lys в девета позиция от пептидната верига с една  $-\text{CH}_2$  група, води до значително засилване на биологичната активност на съединението  $[\text{Orn}^9]\text{N/OFQ}(1-13)\text{NH}_2$  в сравнение с  $\text{N/OFQ}(1-13)\text{NH}_2$  и останалите новосинтезирани аналози;
- скъсяването в другата позиция тринадесет от пептидната верига води до ясно изразено отслабване на инхибиторното действие на съответния пептид  $[\text{Orn}^{13}]\text{N/OFQ}(1-13)\text{NH}_2$  спрямо  $[\text{Orn}^9]\text{N/OFQ}(1-13)\text{NH}_2$

Следователно, биологичната активност се променя значително при минимално скъсяване на дължината на лизиновите аминокиселинни остатъци (само с една  $-\text{CH}_2$  група) в позиции девет и/или тринадесет, в резултат, съответно, от намаляване на разстоянието между основната пептидна верига и активния център на рецептора при тяхното взаимодействие. За проследяване на тази закономерност при по-нататъшното скъсяване на страничната верига на Lys в същите позиции от пептидната верига на  $\text{N/OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ , проведохме следващите експерименти.

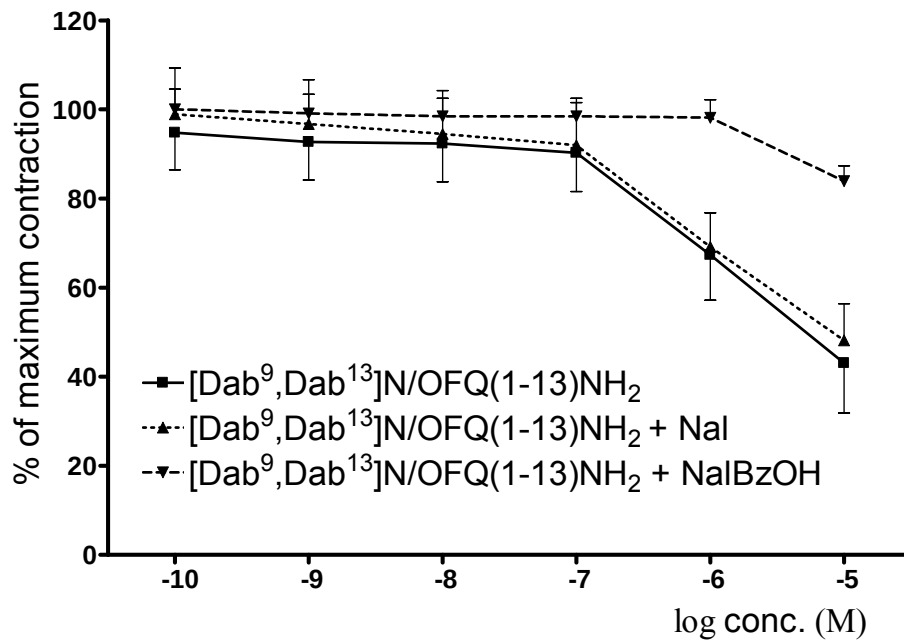
Допълнителното скъсяване на страничната верига на Lys с по още една или две метиленови групи, съответно при производните  $[\text{Dab}^9]\text{N/OFQ}(1-13)\text{NH}_2$  и  $[\text{Dap}^9]\text{N/OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ , доведе до последващо намаляване на биологичната активност (Фиг. 10 и Фиг. 11), по-силно изразено при съединенията  $[\text{Dab}^9, \text{Dab}^{13}]\text{N/OFQ}(1-13)\text{NH}_2$  и  $[\text{Dap}^9, \text{Dap}^{13}]\text{N/OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ , в които Lys е заместена едновременно в двете позиции девет и тринадесет (Фиг. 12 и Фиг. 13) (подобно на заместванията с  $\text{Orn}^9$  и  $\text{Orn}^{13}$ ).



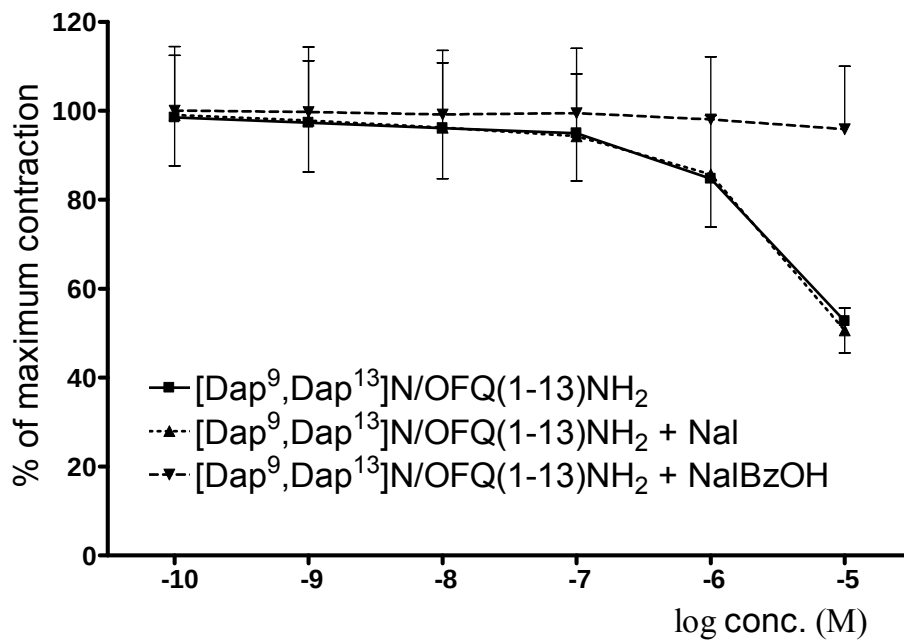
**Фиг. 10.** “Концентрация-отговор” крива на  $[Dab^9]N/OFQ(1-13)NH_2$ , въвеждан преди и след NaI, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.



**Фиг. 11.** “Концентрация-отговор” крива на  $[Dap^9]N/OFQ(1-13)NH_2$ , въвеждан преди и след NaI, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.

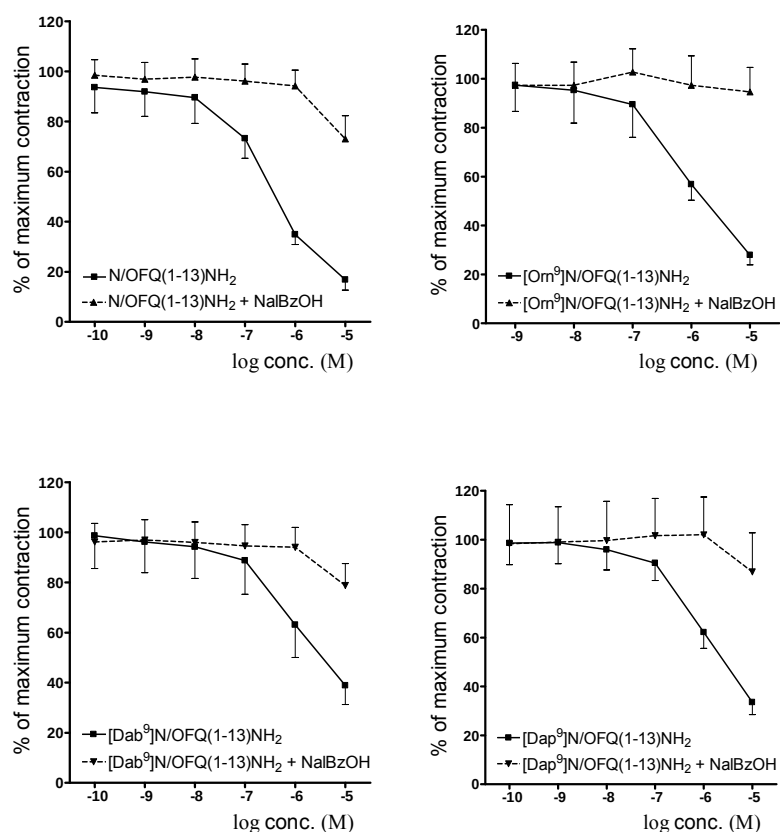


**Фиг. 12.** “Концентрация-отговор” крива на  $[Dab^9,Dab^{13}]N/OFQ(1-13)NH_2$ , въвеждан преди и след Nal или NalBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.



**Фиг. 13.** “Концентрация-отговор” крива на  $[Dap^9,Dap^{13}]N/OFQ(1-13)NH_2$ , въвеждан преди и след Nal или NalBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.

За да потвърдим специфичността на взаимодействието на новосинтезираните пептиди с NOP-рецепторите, в друга серия експерименти използвахме NalBzOH, който в концентрация  $3 \cdot 10^{-5}$  М блокира едновременно опиоидните и ноцицептиновите рецептори (Bucher 1998). В тези случаи, изследваните пептиди нямаха ефект върху съкратителните отговори на гладкомускулните препарати, за разлика от запазването на инхибиторно им действие след претретиране с Nal. Обобщаването на тези данни доказва, че ефектите на изследваните от тази серия производни на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, модифицирани в девета и/или тринадесета позиция, се дължат изцяло на специфично взаимодействие с NOP-рецептора (Фиг. 12 – Фиг. 14).



**Фиг. 14.** “Концентрация-отговор” криви на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, [Dap<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждани преди и след NalBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности ± SEM.

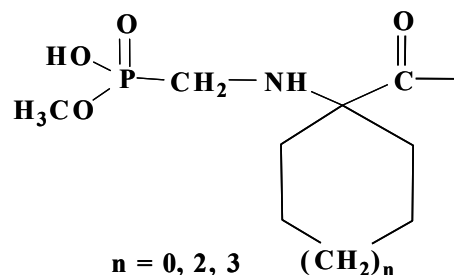
#### 4.1.2. Изследване на биологичната активност на серия модифицирани в N-края нови производни на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> с аминокислотна част

Изследвани са шест модифицирани в N-края производни на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, условно разделени на две групи. В едната от тях - NOC\_1, NOC\_3 и NOC\_5, аминокиселината фенилаланин (Phe) в първа позиция е заместена с {1-[(метоксифосфо)метиламино]циклоалкан карбоксилни киселини}, съдържащи 5-, 7- или 8-атомен пръстен, а в другата - NOC\_2, NOC\_4 и NOC\_6, същите α-аминофосфонови киселини са свързани към Phe<sup>1</sup>. Така получените нови съединения имат следната секвенция:

X-GGFTGARKSARK-NH<sub>2</sub> (NOC\_1, NOC\_3, NOC\_5);

X-FGGFTGARKSARK-NH<sub>2</sub> (NOC\_2, NOC\_4, NOC\_6),

където X е CnAF, съдържаща 5-, 7- или 8-атомен циклоалканов пръстен:



Структурните формули за всяко едно съединение по отделно са представени в раздел „Материали и методи“ (подточка „3.4.1. Фармакологични субстанции“).

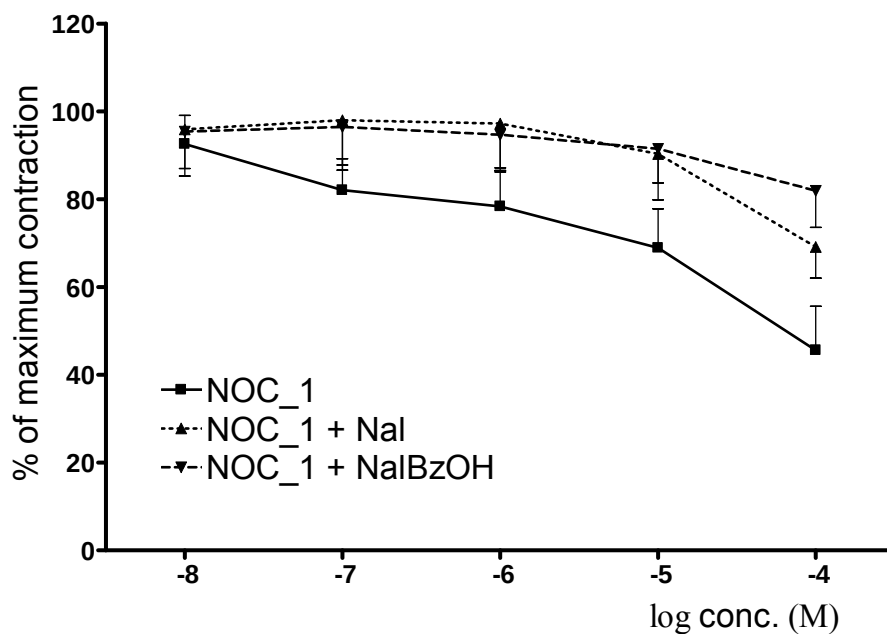
Групата производни NOC\_1, NOC\_3 и NOC\_5, показват по-ниска агонистична активност и ефективност (pEC<sub>50</sub>, E<sub>max</sub>) спрямо N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (Табл. 3). Получените резултати за тази група аналози показват, че те инхибират предизвиканите с LFES гладкомускулни съкращения само в най-високите приложени концентрации 1.10<sup>-7</sup> M – 1.10<sup>-5</sup> M (Фиг. 15 – Фиг. 17). По принцип, такива характеристики на медиатор-рецепторно взаимодействие - слаба ефективност при висок афинитет - се наблюдават за съединенията антагонисти.



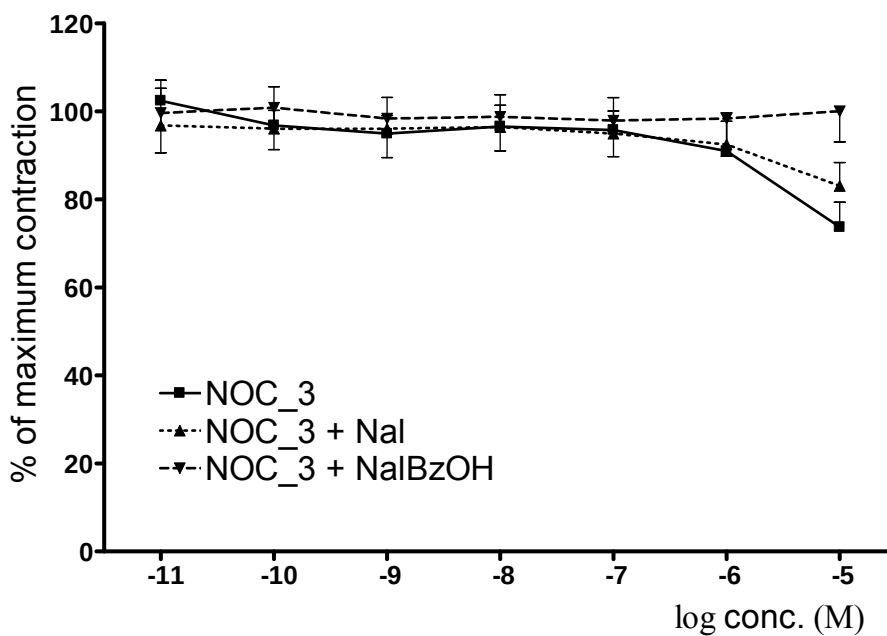
| ИЗСЛЕДВАН<br>ПЕПТИД        | ПЕПТИД            |                      | НАЛОКСОН + ПЕПТИД |                      |
|----------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|                            | pEC <sub>50</sub> | E <sub>max</sub> (%) | pEC <sub>50</sub> | E <sub>max</sub> (%) |
| N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub> | 7.41±0.11         | -85±2                | 7.18±0.13         | -86±3                |
| NOC_1                      | 5.37±0.31         | -54±10               | 4.85±0.72         | -31±7                |
| NOC_2                      | 6.17±0.12         | -68±4                | 5.92±0.08         | -55±9                |
| NOC_3                      | 6.28±0.33         | -26±6                | 5.83±0.36         | -17±5                |
| NOC_4                      | 6.16±0.13         | -69±8                | 6.06±0.06         | -68±5                |
| NOC_5                      | 5.92±0.17         | -48±10               | 5.74±0.72         | -19±8                |
| NOC_6                      | 6.51±0.15         | -90±3                | 6.55±0.10         | -87±5                |

**Таблица 3.** Биологична активност на модифицираните в първа позиция новосинтезирани пептидни аналози на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> върху предизвиканите с LFES съкращения на *vas deferens* от плъх. Данните са представени като средни стойности ± SEM.

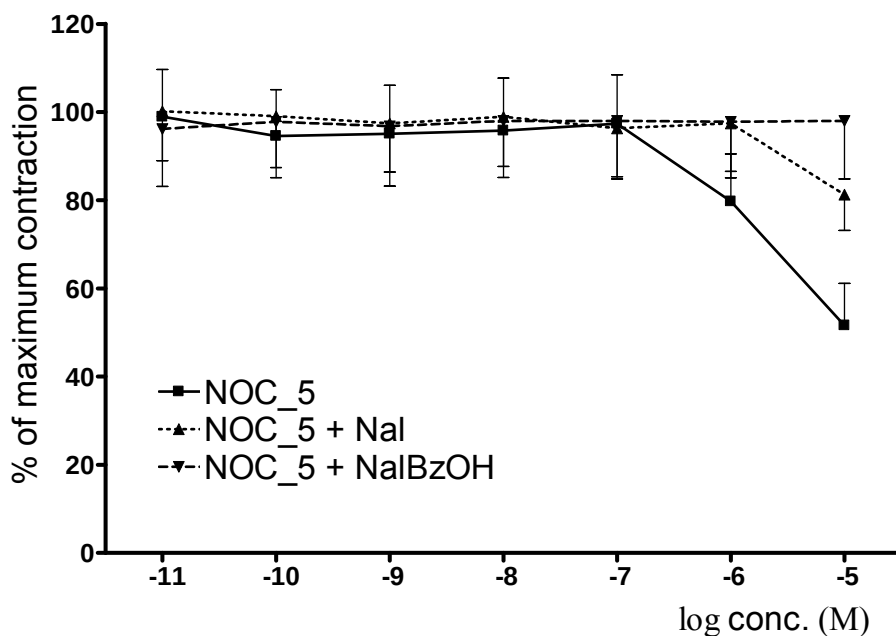
Най-отчетливо, подобна характеристична крива на зависимостта “концентрация-отговор” се демонстрира при NOC\_3, за който получихме pEC<sub>50</sub> = 6.28, при максимален ефект E<sub>max</sub> = -26 в сравнение с E<sub>max</sub> = -85 за N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, което ни даде основание да допуснем, че това съединение би могло да действа като антагонист за NOP-рецептора. За да потвърдим или отхвърлим тази възможност, възникна необходимостта да изследваме това съединение за антагонистично действие. За тази цел, в допълнителна серия експерименти бяха получени кумулативни “концентрация-отговор” криви на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, в присъствие на различни концентрации на NOC\_3 (1.10<sup>-7</sup> М, 1.10<sup>-6</sup> М и 1.10<sup>-5</sup> М) и след преинкубиране на препаратите със смес от пептидазни инхибитори (амастатин, бестатин, каптоприл и фосфорамидон) (Фиг. 18), с оглед предотвратяване на разграждането на изследваните пептиди през времето на инкубация (Nicholson et al., 1998).



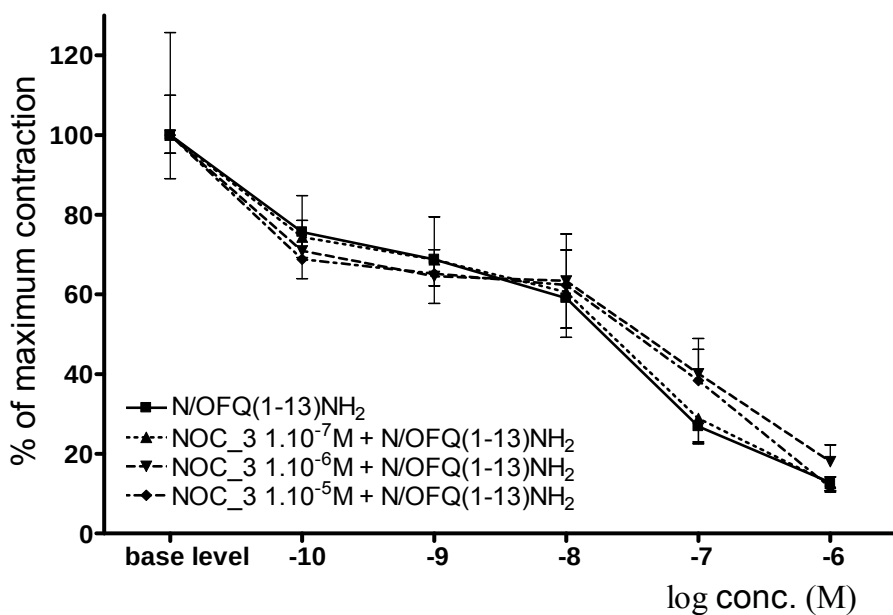
**Фиг. 15.** “Концентрация-отговор” крива на NOC\_1, въвеждан преди и след NaI или NaIBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.



**Фиг. 16.** “Концентрация-отговор” крива на NOC\_3, въвеждан преди и след NaI или NaIBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.



**Фиг. 17.** “Концентрация-отговор” крива на NOC\_5, въвеждан преди и след NaI или NaIBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.



**Фиг. 18.** “Концентрация-отговор” криви на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан в присъствие на NOC\_3 и след преинкубиране на препаратите със смес от пептидазни инхибитори, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.

Получените експериментални резултати не потвърдиха допускането, че NOC\_3 действа като антагонист, тъй като не се наблюдава концентрация зависимо отместване надясно на кумулативните криви за N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, получени в присъствие на NOC\_3, спрямо контролната крива. Следователно, може да се приеме, че NOC\_3 е много слаб агонист на NOP-рецепторите.

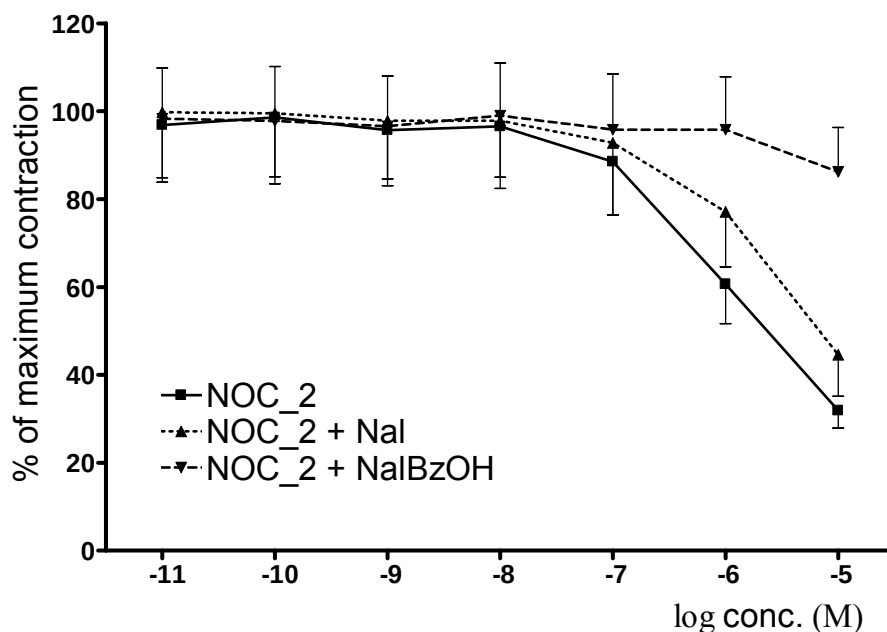
След блокиране на класическите опиоидни рецептори с Nal ( $1 \cdot 10^{-6}$  M), съединенията от тази група (NOC\_1, NOC\_3 и NOC\_5) инхибират значително по-слабо съкращенията на гладкомускулните препарати, а в присъствие на NalBzOH ( $3 \cdot 10^{-5}$  M) изобщо не проявяват инхибиторно си действие. Тези данни свидетелстват за възникване на опиоидоподобна активност при заместване на Phe в първа позиция от пептидната верига на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> с CnAF. Не се установява отчетлива закономерност между уголемяването на цикъла в заместителя и промяната на биологичната активност.

Съединенията от другата група, в която CnAF са свързани към Phe<sup>1</sup> – NOC\_2, NOC\_4 и NOC\_6, проявяват добре изразена агонистична активност ( $pEC_{50} = 6.17 - 6.51$ ), с максимален ефект ( $E_{max} = -68\% - -90\%$ ), много по-голям от този при предходната група (NOC\_1, NOC\_3 и NOC\_5) и близък до този на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (Табл. 3).

Изненадващ се оказва фактът, че съединение NOC\_6, което съдържа най-голям циклоалканов пръстен (8-атомен) в аминоксифонатния заместител, достига същия по стойност максимален ефект, какъвто получаваме за N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, но при 10 пъти по-висока концентрация (Фиг. 21). Получените резултати за другите две съединения от тази група, NOC\_2 и NOC\_4, не показват зависимост между активността им и различната големина на пръстена (5 или 7 атома) в заместителя (Фиг. 19 – Фиг. 20).

Не се наблюдават съществени разлики в инхибиторните ефекти на съединенията от тази група, когато са прилагани самостоятелно или след преинкубиране на гладкомускулните препарати с опиоидния блокатор Nal ( $1 \cdot 10^{-6}$  M) (Фиг. 19 – Фиг. 21). Заедно с това, отсъствието на ефектите след прилагане на  $3 \cdot 10^{-5}$  M NalBzOH (за блокиране и на двата типа рецептори - класически опиоидни и

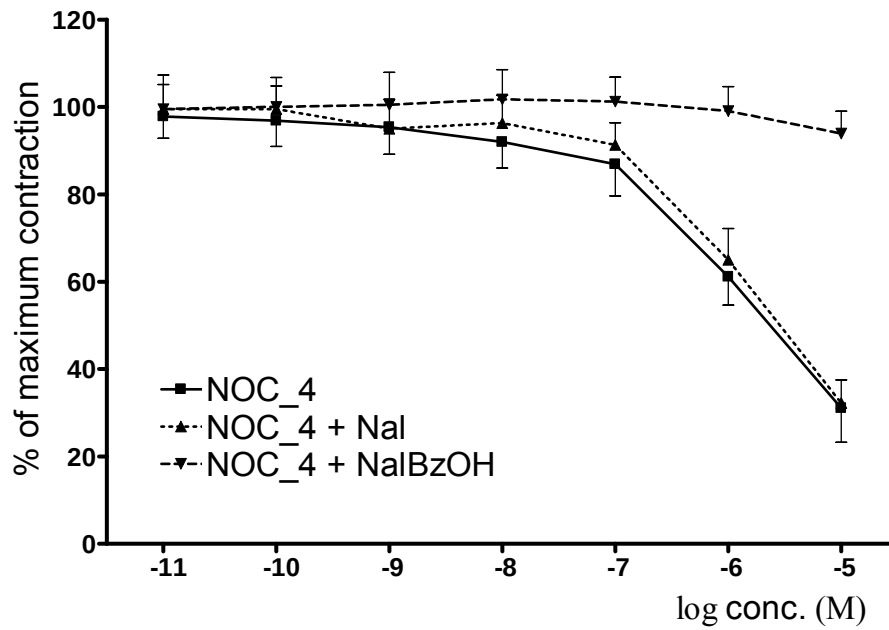
NOP) е доказателство за селективно взаимодействие на NOC\_2, NOC\_4 и NOC\_6 с NOP-рецепторите.



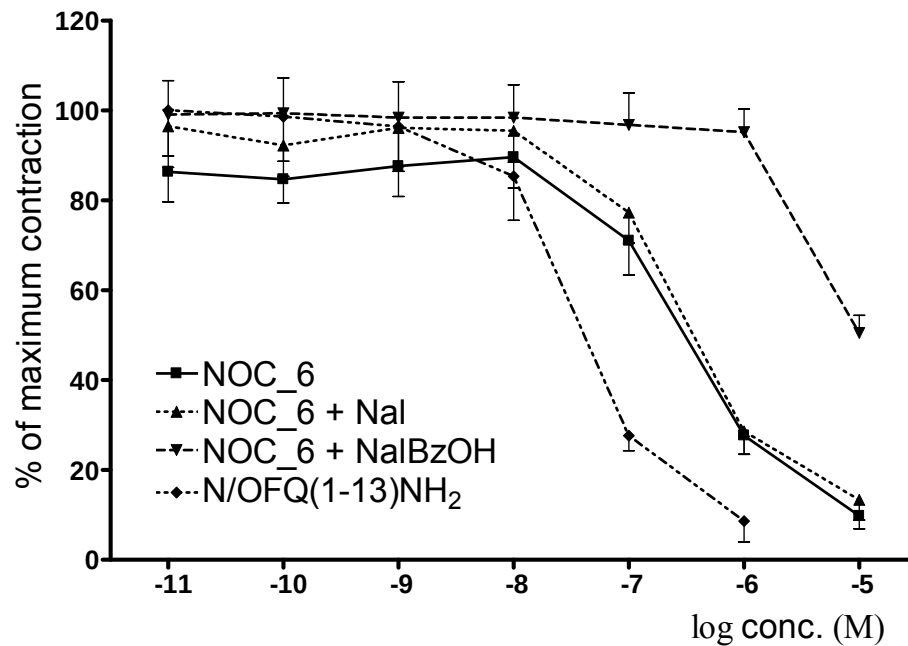
**Фиг. 19.** “Концентрация-отговор” крива на NOC\_2, въвеждан преди и след Nal или NalBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.

От изложените експериментални резултати за ефектите на двете групи производни на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, модифицирани в N-края с CnAF (съдържащи 5-, 7- или 8-атомен пръстен), върху предизвиканите с LFES гладкомускулни съкращения на *vas deferens* от плъх, можем да обобщим, че:

- заместването на Phe в първа позиция от пептидната верига води до понижаване на биологичната активност спрямо N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>;
- биологичната активност се повлиява неблагоприятно и от внедряването на обемен цикличен заместител към Phe<sup>1</sup> в молекулата на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>



**Фиг. 20.** “Концентрация-отговор” крива на NOC\_4, въвеждан преди и след Nal или NalBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.



**Фиг. 21.** “Концентрация-отговор” крива на NOC\_6, въвеждан преди и след Nal или NalBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.

#### 4.1.3. Изследване на биологичната активност на серия модифицирани в N-края нови аналози на хексапептида Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> с аминоксифонатна част

В изпълнение на втората поставена задача е изследвана биологичната активност на пет модифицирани в N-края производни на Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> (съединение 1), използван като базисна структура (Табл. 4). Три от тях са получени чрез заместване на Arg в първа позиция от пептидната верига със същите CnAF (съдържащи 5-, 7- или 8-атомен пръстен), използвани при предходната разгледана група съединения. Получените по този начин нови производни (съединения 3, 4 и 5) имат следната секвенция:



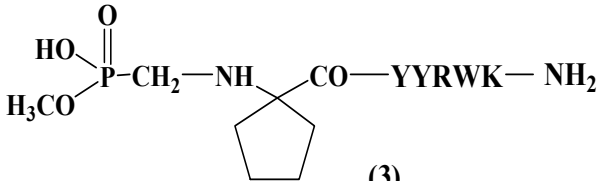
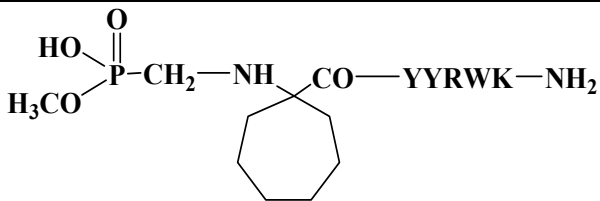
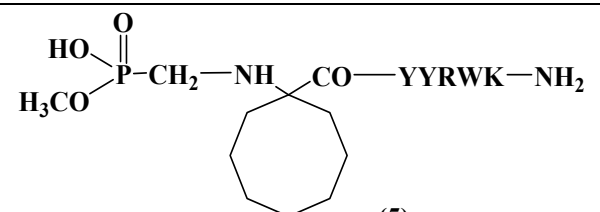
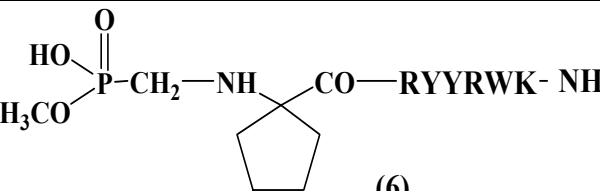
където X е CnAF, съдържаща 5-, 7- или 8-атомен циклоалканов пръстен.

Съединение 6 е хептапептидно производно на Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>, в което  $\alpha$ -аминоксифоновата карбоксилна киселина с 5 атомен циклоалканов пръстен е свързана към Arg<sup>1</sup>, а съединение 2 е със свободен, неацетилян аминокрай (Табл. 4).

Изследваните съединения са въвеждани кумулативно в концентрации  $1 \cdot 10^{-11}$  M –  $1 \cdot 10^{-5}$  M, но поради силната тахифилакия, която предизвикват (подобно на Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>, Dooley et al., 1997), всяка кумулативна “концентрация-отговор” крива - контролна, в присъствие или отсъствие на NaI, или NaIBzOH, е построена въз основа на данните, получени от отделни гладкомускулни препарати.

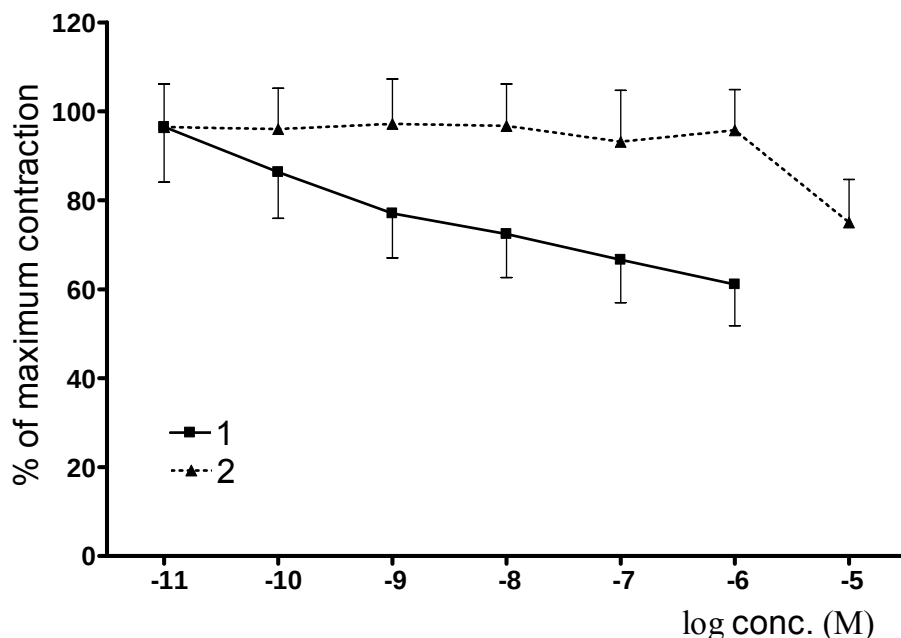
Ефектите на съединенията 2 – 6 са сравнявани с Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> (високоактивен и селективен парциален агонист (Dooley et al., 1977)), който е синтезиран в същата лаборатория и използван като референтно съединение. Получените от нас данни за биологичната му активност ( $pEC_{50} = 8.95$ ;  $E_{max} = -40\%$ ) са близки до литературните ( $pEC_{50} = 9.1$ ;  $E_{max} = -66\%$ ), получени от Но и сътр. (2000).

От сравняването на кумулативните „концентрация-отговор” криви за ефектите на референта и съединение 2 се вижда, че премахването на ацетиловата група води до съществено понижение както на агонистичната активност ( $pEC_{50} = 4.84$ ), така и на ефективността ( $E_{max} = -25\%$ , Фиг. 22).

| ИЗСЛЕДВАНО СЪЕДИНЕНИЕ                                                                      | САМОСТОЯТЕЛНО ПРИЛОЖЕНО |                      | СЪЕДИНЕНИЕ + НАЛОКСОН |                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
|                                                                                            | pEC <sub>50</sub>       | E <sub>max</sub> (%) | pEC <sub>50</sub>     | E <sub>max</sub> (%) |
| $\text{Ac}-\text{RYYRWK}-\text{NH}_2$<br>(1)                                               | 8.95                    | -40.0                | 9.38                  | -44.7                |
| $\text{H}-\text{RYYRWK}-\text{NH}_2$<br>(2)                                                | 4.84                    | -25.0                | 4.94                  | -7.7                 |
| <br>(3)   | 5.82                    | -16.2                | 4.83                  | -7.67                |
| <br>(4)  | 4.81                    | -7.4                 | 4.87                  | -9.44                |
| <br>(5) | 4.78                    | -3.25                | 4.83                  | -5.63                |
| <br>(6) | 5.08                    | -25.6                | 5.19                  | -23.5                |

**Таблица 4.** Биологична активност на новосинтезираните производни на Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>, модифицирани в първа позиция, върху предизвиканите с LFES съкращения на *vas deferens* от плъх. Данните са представени като средни стойности.

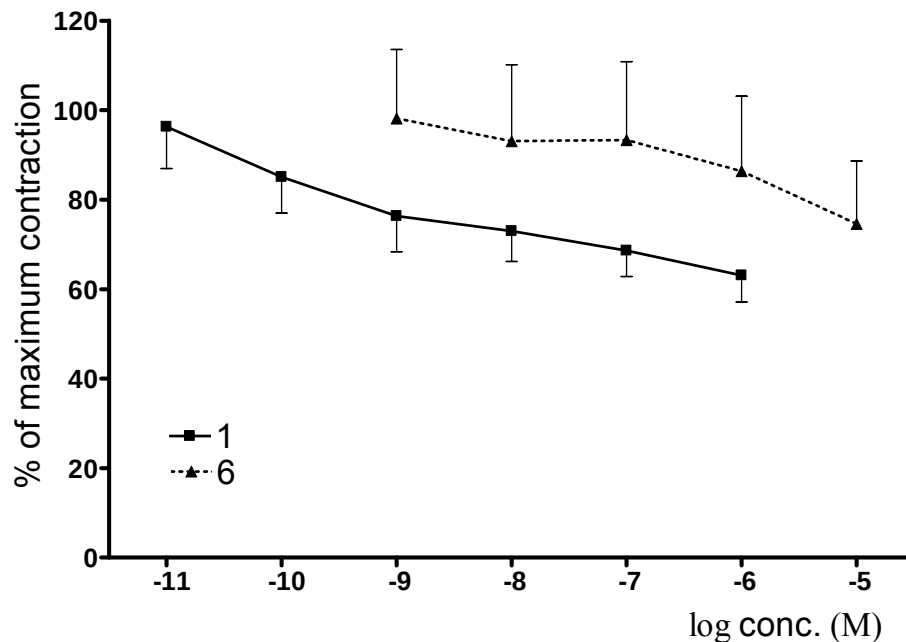




**Фиг. 22.** “Концентрация-отговор” крива на референта (Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>) (1) и H-RYYRWK-NH<sub>2</sub> (2) върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  SEM.

Подобно редуциране на активността ( $pEC_{50} = 5.08$ ) се наблюдава и след заместване на ацетиловата група с CnAF с 5-атомен циклоалканов пръстен (съединение 6, Фиг. 23). Въпреки това, действието на хептапептида остава специфично за NOP-рецептора, тъй като не се наблюдава разлика между кумулативните криви в присъствие или отсъствие на Nal ( $1 \cdot 10^{-6}$  M) и инхибиторният ефект на хептапептида не се проявява изобщо след едновременното блокиране на ноцицептиновите, и на класическите опиоидни рецептори с NalBzOH ( $3 \cdot 10^{-5}$  M). Тези резултати не са показани графично, защото (както вече беше отбелязано) поради регистрираната тахифилаксия всички кумулативни криви са получени на отделни гладкомускулни препарати.

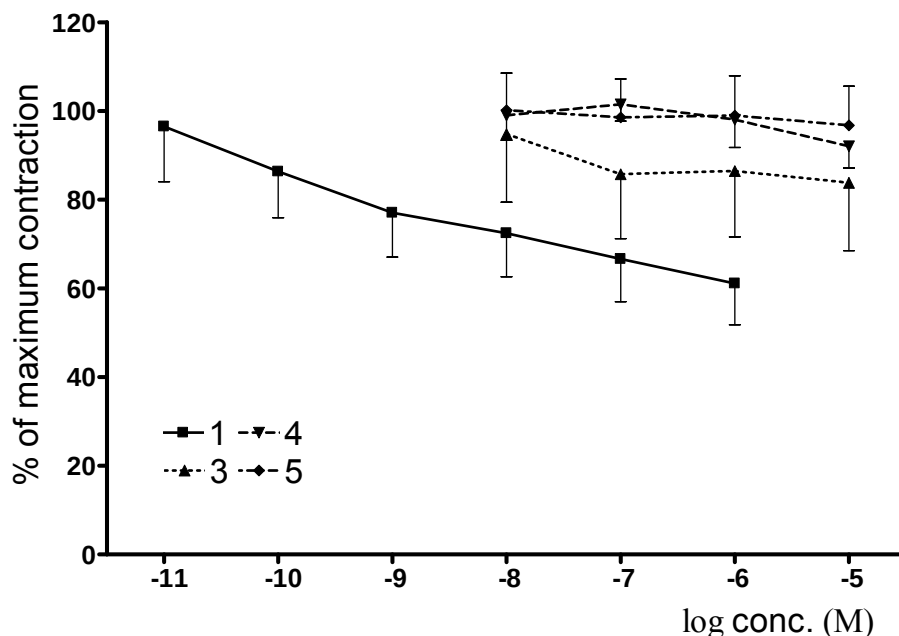
На Фиг. 24 са сравнени кумулативните криви на референта и съединенията (3, 4 и 5), в които Arg<sup>1</sup> е заместена с CnAF. Графиката показва, че в относително ниски концентрации ( $1 \cdot 10^{-8}$  M –  $1 \cdot 10^{-7}$  M), съединение 3 умерено потиска предизвиканите с LFES съкращения на *vas deferens*, в сравнение със съединение 1.



**Фиг. 23.** “Концентрация-отговор” крива на референта (Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>) (1) и хептапептида (съединение 6) върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности ± SEM.

Трябва да се отбележи, че след блокиране на класическите опиоидни рецептори с Nal (1.10<sup>-6</sup> M), инхибиторните му ефекти не се проявяват и стойността pEC<sub>50</sub> = 4.83 става много близка до тази след NalBzOH - pEC<sub>50</sub> = 5.0. Следователно, може да се предположи, че това съединение (3) инхибира гладкомускулните съкращения не вследствие на взаимодействие с ноцицептиновия рецептор, а с класическите опиоидни рецептори и вероятно е техен агонист. При съединения 4 и 5, уголемяването на цикъла корелира с намаляване на стойностите за pEC<sub>50</sub> и E<sub>max</sub>. Може да се каже, че тези две съединения не повлияват амплитудата на гладкомускулните съкращения (Фиг. 24).

От получените резултати можем да обобщим, че когато в молекулата на хексапептидните аналози се съдържа Arg в първа позиция от пептидната верига, се запазват афинитета и селективността към NOP-рецепторите (съединение 6), а уголемяването на цикъла в заместителя води до почти пълна загуба на биологична активност.



**Фиг. 24.** “Концентрация-отговор” крива на референта (Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>) (1) и хексапептидните аналози (3 — 5) върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности ± SEM.

## 4.2. ЕКСПЕРИМЕНТИ *IN VIVO* ВЪРХУ МОДЕЛ НА ОСТРО ПЕРИФЕРНО ВЪЗПАЛЕНИЕ

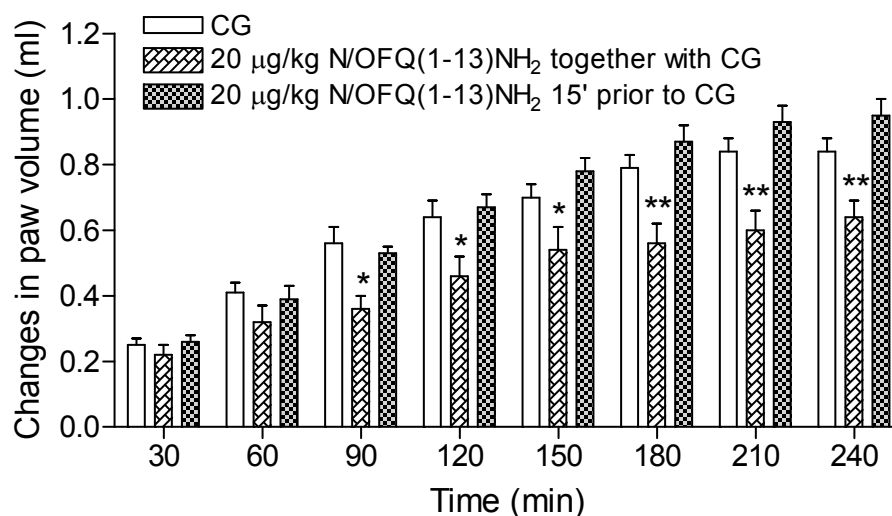
### 4.2.1. Изследване на ефектите на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и структурните му аналози [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> върху предизвикано с λ-карагенан възпаление

За да изясним механизма на действие на N/OFQ *in vivo* нашата експериментална работа продължи с изследване и сравняване на ефектите на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и структурните му аналози [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, и [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (показали най-голяма ефективност при опитите върху гладки мускули) върху експериментален модел на предизвикано с CG остро, периферно възпаление в задна дясна лапа на плъх.

При проведените от нас експерименти, в съответствие с литературните данни, инжектиран *i.pl.* 0.1 ml/1% разтвор на CG (контролна група животни) предизвика възпаление и оток, който се развива с времето и достигна своя

максимум около 180 - 210-та минута (3<sup>-ти</sup> – 3.5<sup>-ти</sup> час), след което остана почти непроменен до края на четвъртия час.

Въвеждането на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> в доза 20 µg/kg (i.p.) едновременно с CG потиска статистически достоверно развитието на отока още на 90-тата минута от началото на опита. Този инхибиторен ефект е добре изразен, както спрямо третираната само с CG група животни, така и спрямо групата, в която N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> е инжектиран 15 мин. преди CG (Фиг. 25).



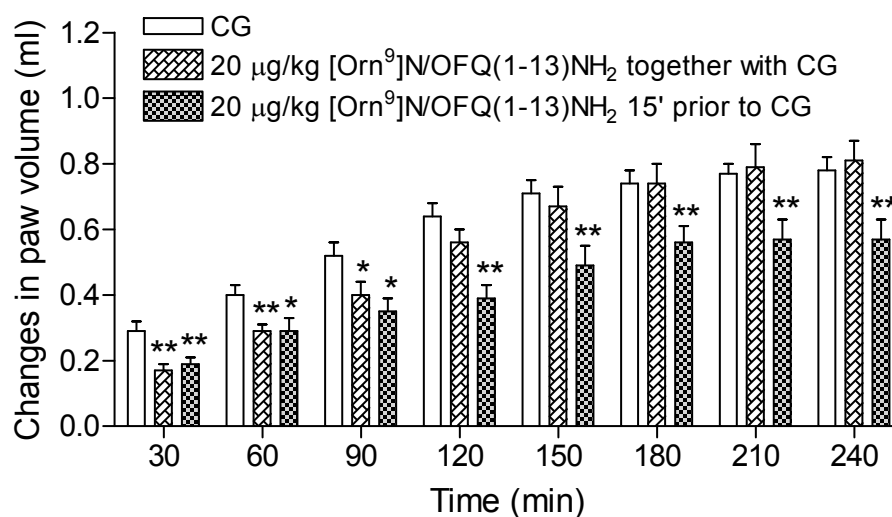
**Фиг. 25.** Ефекти на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> върху предизвикано с CG остро възпаление: обемът на лапата е измерван на всеки 30 минути (за период от 4 часа) след инжектиране на CG, приет за начален момент. Данните са представени като средни стойности ± SEM от 7 - 9 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG, се приемат разлики, при които \*p<0.05; \*\*p<0.01.

В края на четвъртия час, големината на отока на възпалените лапи на третираната с N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>/CG (при едновременно въвеждане) група животни е подчертано по-малка, в сравнение с тази, третирана само с CG. Общо, динамиката на развитие на отока е еднаква за двете групи: третирани едновременно с N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>/CG или само с CG.

Инжектиран i.p. 15 мин. преди CG, обаче, N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (в същата доза 20 µg/kg) не потиска образуването на оток. Противоположно на това, дори се наблюдава

тенденция към увеличаване на едема на възпалените лапи след 150-та минута, спрямо контролната група животни (третирани само с CG).

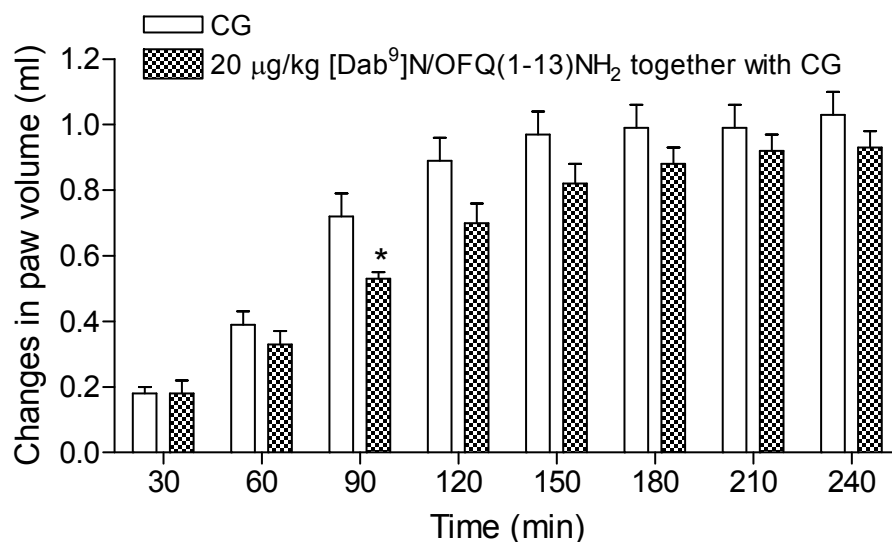
Второто изследвано съединение в доза 20 µg/kg, [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, потиска забележимо и статистически достоверно възпалителния процес още в самото начало на развитието му (от 30-та до 90-тата минута), в приблизително еднаква степен, независимо дали е въвеждано 15 мин. преди CG или едновременно с него (Фиг. 26). След 120-та минута до края на експеримента, отокът на лапите в групата, третирана с [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> 15 мин. преди CG, остава значително и статистически достоверно по-малък в сравнение с контролната група (третирана само с CG). При инжектираната едновременно с [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>/CG група животни, обаче, измерваните стойности за обема на лапата не се отличават от контролните (Фиг. 26).



**Фиг. 26.** Ефекти на [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> върху предизвикано с CG остро възпаление: обемът на лапата е измерван на всеки 30 минути (за период от 4 часа) след инжектиране на CG, приет за начален момент. Данните са представени като средни стойности ± SEM от 7 - 9 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG, се приемат разлики, при които \*p<0.05; \*\*p<0.01.

Подобно на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, структурният му аналог [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, инжектиран i.p. в доза 20 µg/kg, едновременно с CG, потисна слабо развитието на едема на възпалените лапи, статистически достоверно само на 90-та

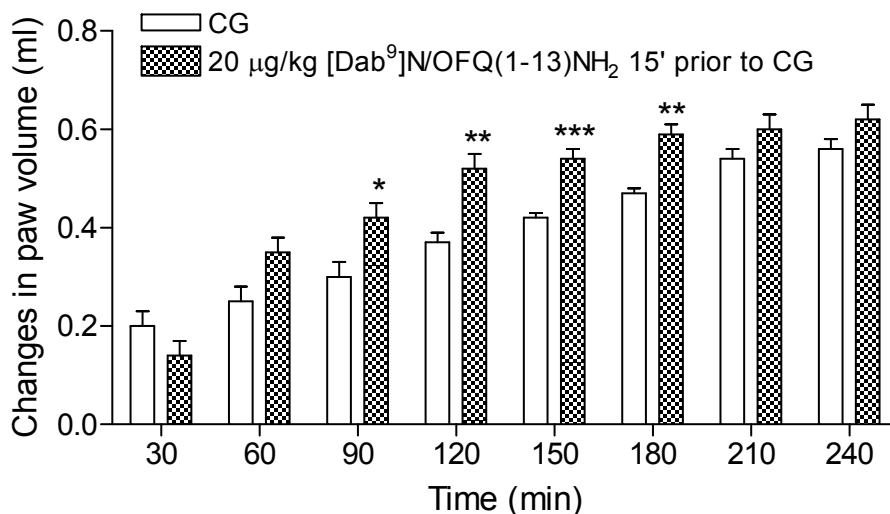
минута (Фиг. 27). След 150-та минута, до края на наблюдението стойностите за обема на възпалените лапи при двете групи (инжектирана едновременно с  $[Dab^9]N/OFQ(1-13)NH_2/CG$  и контролната третирана само с CG група) остават близки.



**Фиг. 27.** Ефекти на  $[Dab^9]N/OFQ(1-13)NH_2$  върху предизвикано с CG остро възпаление: обемът на лапата е измерван на всеки 30 минути (за период от 4 часа) след инжектиране на CG, приет за начален момент. Данните са представени като средни стойности  $\pm$  SEM от 6 - 9 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG, се приемат разлики, при които  $*p < 0.05$ .

При i.p. въвеждане на  $[Dab^9]N/OFQ(1-13)NH_2$  в доза 20 µg/kg 15 минути преди CG, обаче, след 30-та минута се наблюдава отчетливо увеличаване на отока на възпалените лапи от първия до третия час спрямо третираната само с CG група (контролната), което е статистически достоверно от 90-та до 180-та минута (Фиг. 28).

За да изясним дали  $N/OFQ(1-13)NH_2$  и  $[Orn^9]N/OFQ(1-13)NH_2$  повлияват процесите на образуване на свободни радикали, съпътстващи възпалението (като възможна страна от техния механизъм на действие), предвидихме допълнителни изследвания на техните ефекти върху предизвиканите с CG промени в антиоксидантния статус на тъканни хомогенати от лапа. Тези опити са извършени в лаборатория "Свободно-радикални процеси" (ИНБ - БАН).



**Фиг. 28.** Ефекти на [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> върху предизвикано с CG остро възпаление: обемът на лапата е измерван на всеки 30 минути (за период от 4 часа) след инжектиране на CG, приет за начален момент. Данните са представени като средни стойности  $\pm$  SEM от 6 - 7 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG, се приемат разлики, при които \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Въз основа на получените от нас резултати можем да обобщим, че при използваните експериментални условия N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и структурният му аналог [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> не действат като про- или антиоксиданти, а повлияват по-скоро невrogenното възпаление.

#### 4.2.2. Проучване на връзката в механизма на действие на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, структурния му аналог [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и канабиноидите върху предизвикано с $\lambda$ -карагенан възпаление

Представените в литературния обзор и анализирани данни предполагат наличието на връзка в механизмите на действие на ноцицептина и канабиноидите при възпалителния процес, в които е влято участие на ванилоидните рецептори.

При предварителни изследвания със смесения CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>- канабиноиден агонист WIN 55,212-2 (5 mg/kg) установихме, че той не повлиява съществено предизвикания с CG оток на лапата, докато CB<sub>1</sub>- рецепторния агонист HU-210 го

потиска значително в сравнение с контролната група. По тази причина следващите експерименти проведохме само с агониста на CB<sub>1</sub>-рецепторите HU-210.

В тази серия опити, като агонисти на ноцицептиновите рецептори са използвани N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. едновременно с CG в доза 20 µg/kg и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, въвеждан i.p. в същата доза, но 15 мин. преди CG, за които при предходните изследвания установихме, че имат противовъзпалително действие при използваните експериментални условия.

За да потвърдим или отхвърлим възможното участие на TRPV1-рецепторите в ефектите на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и структурния му аналог [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и връзката им с канабиноидната система, изследвахме:

1) Какъв е ефектът върху острото възпаление от едновременно въвеждане на канабиноиди и N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> или на канабиноиди и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>;

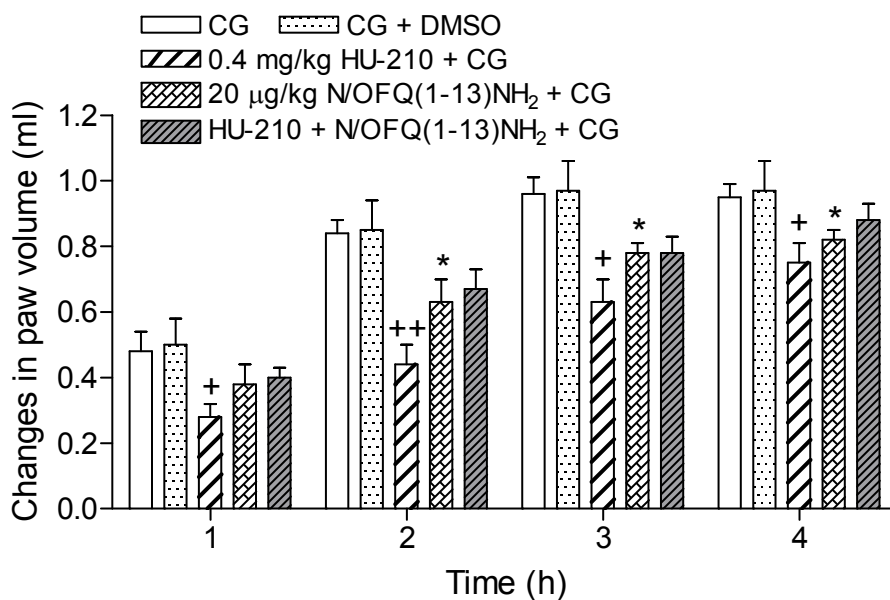
2) Дали инхибирането на канабиноидните рецептори повлиява противовъзпалителните ефекти на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и обратно – какво е действието на антагонисти на N/OFQ върху противовъзпалителните ефекти на канабиноидите;

3) Дали инхибирането на TRPV1-рецепторите предотвратява противовъзпалителното действие на канабиноидите, N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>.

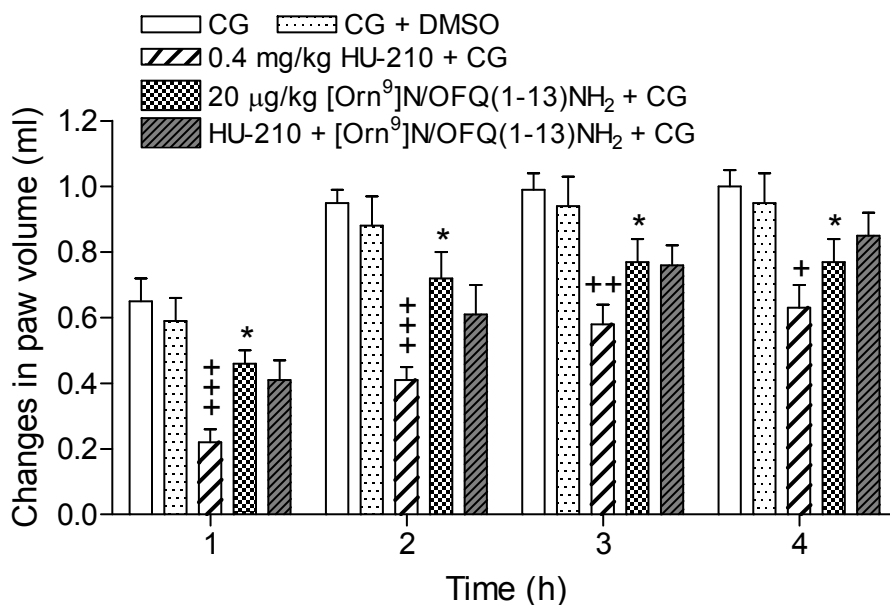
Приложен i.p. в доза 0.4 mg/kg, специфичният CB<sub>1</sub>-рецепторен агонист HU-210 потиска значително и статистически достоверно предизвикания с CG оток на лапата още от първия час, в сравнение с контролната група (инжектирана с CG и DMSO). Този ефект се запазва през целия период на наблюдение (четири часа). Инхибиторният ефект на самостоятелно въвеждане HU-210 върху възпалението е значителен и по-силен от този на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (Фиг. 29) и неговия аналог [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, макар също да е статистически достоверен (Фиг. 30).

И в двата случая, обаче, едновременното въвеждане на агонисти на двата рецептора (CB<sub>1</sub> и NOP) не засилва противовъзпалителния ефект, а има по-скоро адитивен характер (Фиг. 29, Фиг. 30).



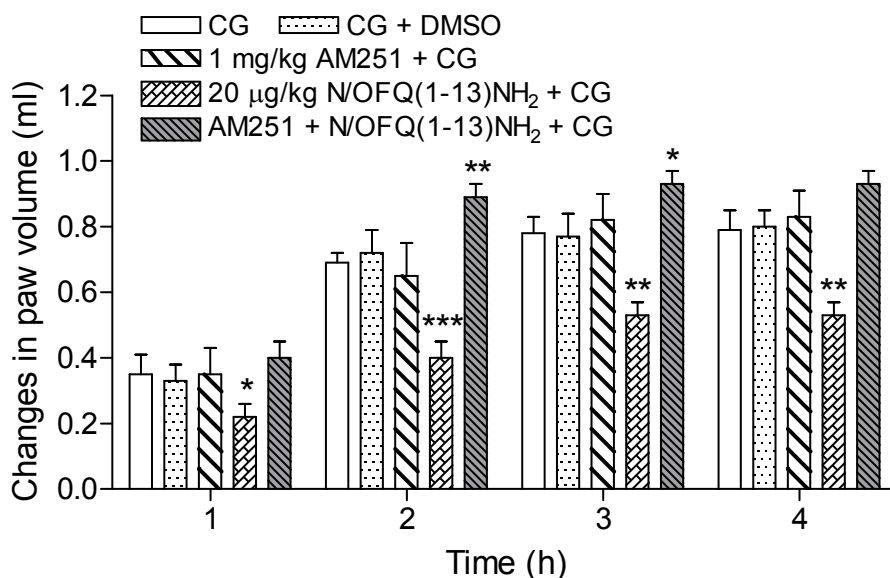


**Фиг. 29.** Ефекти на HU-210, N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и комбинираното им прилагане върху предизвиканото с CG остро възпаление. Данните са представени като средни стойности  $\pm$  SEM от 6 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни се приемат разлики, при които \* $p < 0.05$  спрямо групата, третирана с CG и + $p < 0.05$ ; ++ $p < 0.01$  спрямо групата, третирана с CG + DMSO.



**Фиг. 30.** Ефекти на HU-210, [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и комбинираното им прилагане върху предизвиканото с CG остро възпаление. Данните са представени като средни стойности  $\pm$  SEM от 6 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни се приемат разлики, при които \* $p < 0.05$  спрямо групата, третирана с CG и + $p < 0.05$ ; ++ $p < 0.01$ ; +++ $p < 0.001$  спрямо групата, третирана с CG + DMSO.

Въведен i.p. в доза 1 mg/kg, CB<sub>1</sub>-рецепторният антагонист AM251 не повлиява съществено отока на възпалената лапа, в сравнение с контролата. Въведени след блокиране на CB<sub>1</sub>-рецепторите, N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> не проявяват присъщия им потискащ възпалението ефект, демонстриран при самостоятелното им прилагане (Фиг. 31, Фиг. 32).

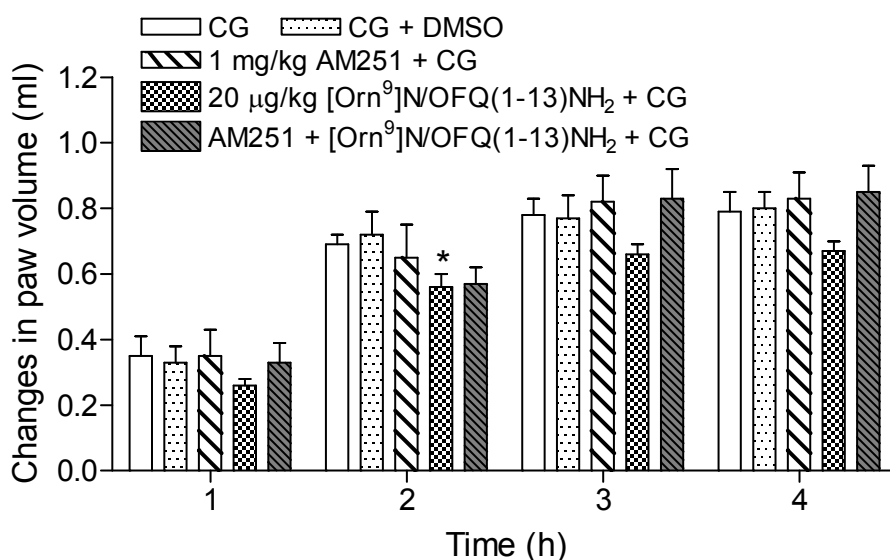


**Фиг. 31.** Ефекти на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> върху предизвиканото с CG остро възпаление, след блокиране на CB<sub>1</sub>-рецепторите с AM251. Данните са представени като средни стойности ± SEM от 6 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG, се приемат разлики, при които \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Нещо повече – от втория час до края на експеримента, третираната с AM251 + N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> група показва завишени, макар и статистически недостоверни разлики в измерения обем на лапите спрямо контролите. Очевидно, блокирането на CB<sub>1</sub>-рецепторите предотвратява противовъзпалителното действие на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>.

Вследствие на изложените резултати, може да се допусне, че за да се проявят ефектите на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и неговия аналог [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> е необходимо или предварителното активиране на CB<sub>1</sub>-рецепторите, или че самият N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> активира канабиноидните рецептори. По-големият оток на

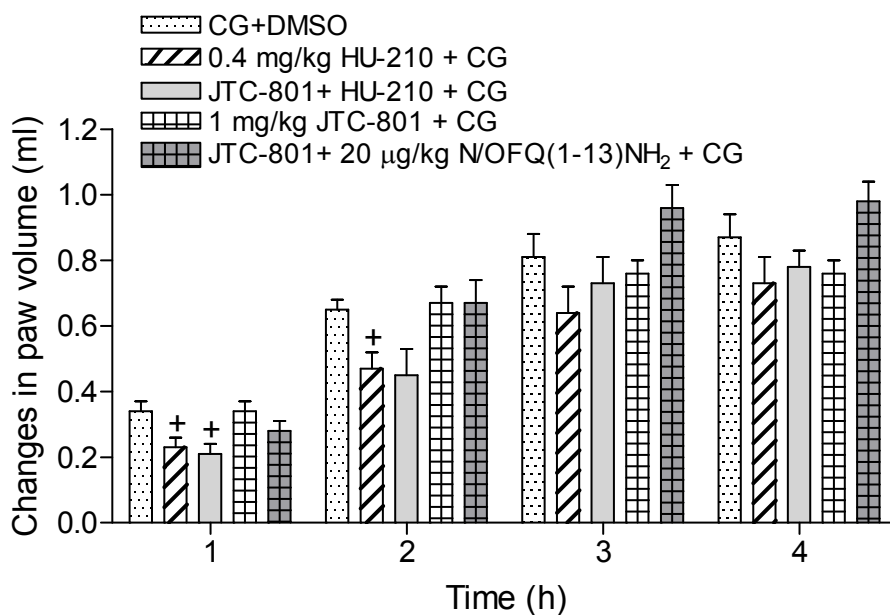
възпалената лапа в групата, инжектирана с AM251 и N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, би могъл да се дължи на способността на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> да предизвиква отделяне на хистамин и други проинфламаторни медиатори от мастоцитите или да активира хемотаксиса на неутрофили и лимфоцити.



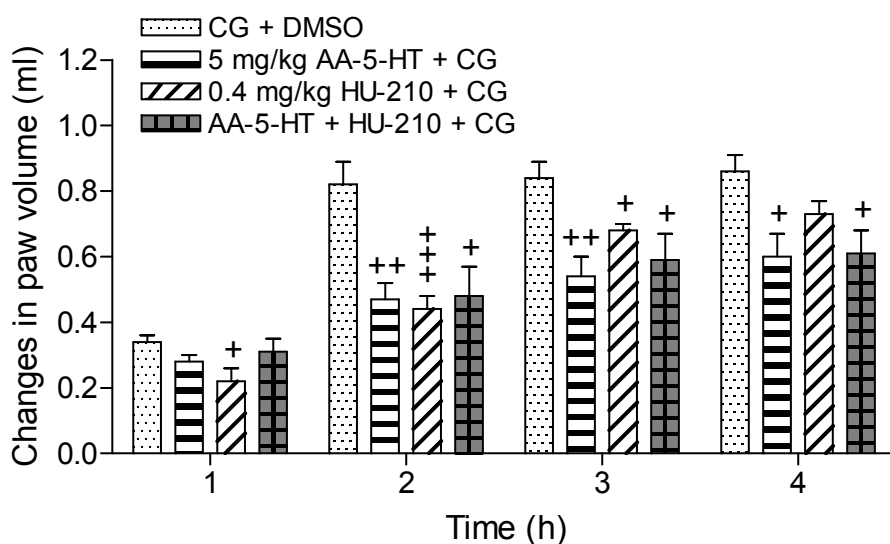
**Фиг. 32.** Ефекти на [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> върху предизвиканото с CG остро възпаление, след блокиране на CB<sub>1</sub>-рецепторите с AM251. Данните са представени като средни стойности ± SEM от 6 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG, се приемат разлики, при които \*P<0.05.

От друга страна, въздействието на HU-210 върху възпалението не се променя от блокирането на ноцицептиновите рецептори и следователно не е зависимо от функционалното състояние на NOP-репторите. Ефектите на CB<sub>1</sub>-агониста след самостоятелното му прилагане или инжектиран след антагониста за NOP-рецепторите JTC-801 (въведен i.p. в доза 1 mg/kg) са еднакви (Фиг. 33).

За да проверим дали TRPV1-рецепторите участват в реализирането на ефекта на канабиноидите, N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, изследвахме тяхното действие върху възпалението след предварително третиране на животните с инхибитора на ванилоидните рецептори AA-5-HT, инжектиран i.p. в доза 1 mg/kg (Фиг. 34).



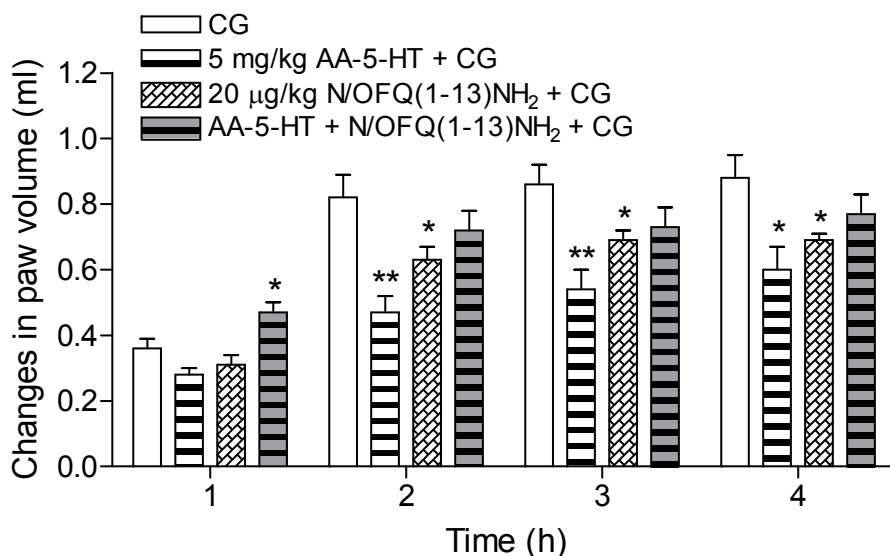
**Фиг. 33.** Ефекти на HU-210 върху предизвиканото с CG остро възпаление, след блокиране на ноцицептиновите рецептори с JTC-801. Данните са представени като средни стойности  $\pm$  SEM от 6 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG + DMSO, се приемат разлики, при които  $+p<0.05$ .



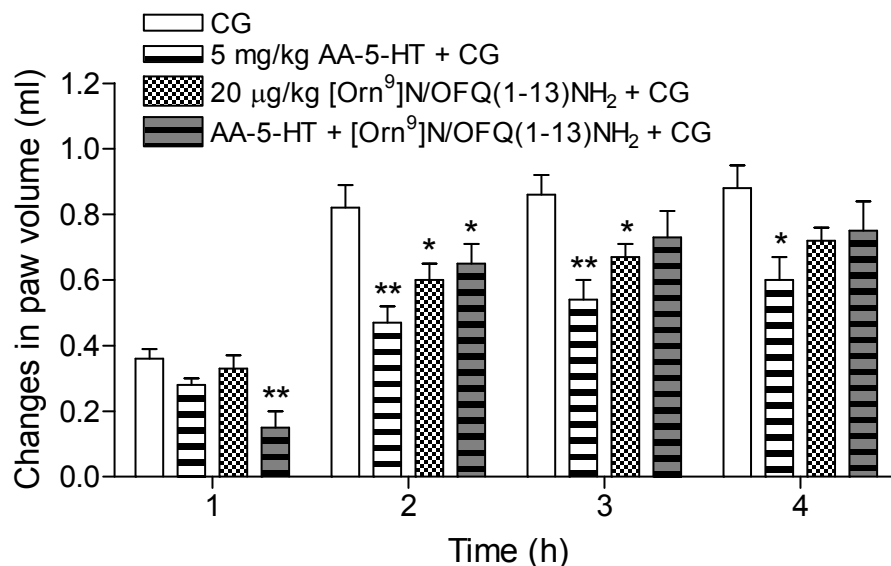
**Фиг. 34.** Ефекти на HU-210 върху предизвиканото с CG остро възпаление, след блокиране на TRPV1-рецепторите с AA-5-HT. Данните са представени като средни стойности  $\pm$  SEM от 6 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG + DMSO, се приемат разлики, при които  $+p<0.05$ ;  $++p<0.01$ ;  $+++p<0.001$ .

Измерените стойности за обема на лапата при самостоятелното прилагане на АА-5-НТ или НУ-210, както и на комбинацията АА-5-НТ/НУ-210/СГ, почти не се различават за целия период на наблюдение. Запазването на потискащото отока действие на НУ-210, въведен след блокиране на ванилоидните рецептори с 5 mg/kg АА-5-НТ, показва, че ванилоидните рецептори не участват в реализиране на ефекта му.

Същевременно, инжектирането на опитните животни с N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> или с [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, след третирането им с АА-5-НТ, като цяло не предотвратява инхибиторното действие на изследваните пептиди – обемът на възпалената лапа е близък до този след самостоятелното прилагане на пептидите (Фиг. 35, Фиг. 36) и при всички случаи е по-голям, отколкото след самостоятелното прилагане на АА-5-НТ. Интересна е наблюдаваната изразена разлика в ефектите на двата структурно много близки пептида след първия час от инжектирането им: проинфламаторен за N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>/АА-5-НТ и противоположен – противовъзпалителен за [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> /АА-5-НТ).



**Фиг. 35.** Ефекти на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> върху предизвиканото с СГ остро възпаление, след блокиране на TRPV1-рецепторите с АА-5-НТ. Данните са представени като средни стойности ± SEM от 6 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с СГ, се приемат разлики, при които \*p<0.05; \*\*p<0.01.



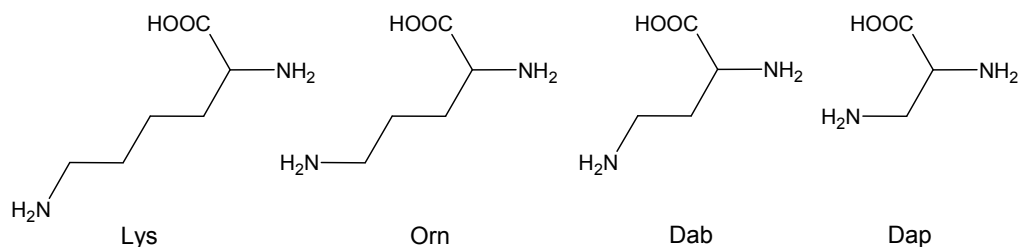
**Фиг. 36.** Ефекти на [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> върху предизвиканото с CG остро възпаление, след блокиране на TRPV1-рецепторите с AA-5-HT. Данните са представени като средни стойности  $\pm$  SEM от 6 животни за всяка експериментална група (с изключение на групата с [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> + CG – 4 животни). За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG, се приемат разлики, при които \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Последните резултати показват, че изследваните съединения (N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>) реализират ефектите си независимо от ванилоидните рецептори, активирайки собствените си NOP-рецептори.

## V. ОБСЪЖДАНЕ

Изследвана е биологичната активност на синтезираните на основата на концепцията “message/address” три серии нови лиганди за ноцицептиновия рецептор с различна дължина на основната верига (шест или тринадесет аминокиселини) и малки структурни промени в приетите съответно за свързваща (“address domain”) или активираща (“message domain”) NOP-рецептора част от молекулта на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>, използвани като базисна матрица.

За да проследим как се променя биологичната активност след последователно скъсяване на страничната верига на Lys с една, две или три метиленови групи, отразява ли се това и как на взаимодействието с NOP-рецептора, в първата серия NOP-рецепторни лиганди ключовата за биологичната активност аминокиселина Lys в позиция девет и/или тринадесет от N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> е заместена съответно с Orn, Dab или Dap (Фиг. 37):



**Фиг. 37.** Структурни формули на аминокиселините в девета и/или тринадесета позиция от пептидната верига на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и неговите новосинтезирани производни.

При проведените експерименти, тази серия аналози на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> проявяват инхибиторно действие върху предизвиканите с LFES гладкомускулни съкращения на *vas deferens*, без да променят тонаса на препаратите. Запазването на инхибиторния ефект след преинкубиране на сегментите с опиоидния антагонист Nal (10<sup>-6</sup> M) ни дава основание да приемем, че този ефект най-вероятно не се дължи на взаимодействието им с класическите опиоидни рецептори. Получените от нас резултати за N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> са подобни на докладваните от Rizzi и съавт. (2001)

върху същите препарати. Имайки предвид и факта, че потискането на съкращенията не се проявява в присъствие на  $3 \cdot 10^{-5}$  M NaIBzOH (след едновременното блокиране на класическите опиоидни и ноцицептиновите рецептори), може да се направи заключението, че то се осъществява посредством селективно взаимодействие с NOP-рецепторите.

Резултатите от нашите изследвания показват, че заместването на Lys с Orn в позиция девет предизвиква повишаване на биологичната активност, в сравнение с N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и останалите новосинтезирани аналози. Подобно заместване в позиция тринадесет, обаче, води до противоположен ефект. Тъй като направените структурни промени в молекулата на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> засягат важните за свързването с рецептора аминокиселини (“address domain”), логично е наблюдаваните разлики в биологичната активност на новите съединения от тази серия да се дължат на промяна във взаимодействието с NOP-рецепторите. Защото, както беше изложено в литературния обзор, положително заредените аминокиселинни остатъци на Arg<sup>8</sup>, Arg<sup>12</sup> и Lys<sup>9</sup>, Lys<sup>13</sup> са от решаващо значение за окупирането на NOP-рецепторите и се предполага, че взаимодействат с отрицателно заредените аминокиселинни остатъци от втората екстрацелуларна бримка на ноцицептиновия рецептор (Mollereau et al., 1999; Guerrini et al., 2000b). Очаквано е направените структурни модификации в пептидната верига на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> да предоставят на неговите деривати различна степен на структурна комплементарност със свързващия център на рецептора и оттам на различни възможности за конформационни промени при взаимодействието им. Следователно, вероятно е по-силно изразената агонистична активност на [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> да е следствие от повишаване на афинитета за свързване към рецептора, което от своя страна би могло да е резултат от по-добро пространствено разположение на аминокиселината в позиция девет от пептидната верига спрямо нейното място за взаимодействие с рецептора. По-ниските стойности за pEC<sub>50</sub> на [Orn<sup>13</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> сочат, че структурни промени в страничната верига на Lys в позиция тринадесет се отразяват негативно на биологичната активност. Можем да приемем, че при заместването на Lys в позиция девет с Orn се получава оптимално за функционирането на центъра на свързване отстояние на аминокиселината от



страничната верига на лизина, което не се наблюдава при същото заместване в позиция тринадесет.

Съединенията, получени при следващите замествания на Lys с Dab или Dar в позиция девет или едновременно в двете позиции (девет и тринадесет), инхибират по-слабо гладкомускулните съкращения в сравнение с  $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ , т.е. скъсяването на страничната верига на Lys с повече от една  $-\text{CH}_2$  група се оказва неблагоприятно за агонистичната активност. Вероятно е по-силното скъсяване на страничната верига на Lys съществено да отслабва електростатичното взаимодействие и съответно формирането на йонни двойки с отрицателно заредените аминокиселинни остатъци в активния център на рецептора, тъй като тези сили на привличане зависят от разстоянието.

Въпреки силно намалената ефективност, слабото потискащо действие върху гладкомускулните съкращения, регистрирано при въвеждане на високи концентрации от тези пептиди е в резултат на селективно взаимодействие с NOP-рецептора.

Въз основа на анализа на събраните данни може да се направи заключението че дължината на страничната верига на Lys и в двете позиции - девет и тринадесет, е от съществено значение за свързването с активния център на NOP-рецептора и съответно за биологичната активност.

В резултат на редица проучвания върху “структура-активност” на N-крайния тетрапептиден фрагмент от пептидната верига на  $\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$  (Dooley and Houghten, 1996; Reinscheid et al., 1996; Butour et al., 1997; Guerrini et al., 1997; Guerrini et al., 2000a) е известно, че разстоянието между  $\text{Phe}^1$  и  $\text{Phe}^4$ , както и наличието на ароматните остатъци на Phe в първа и особено четвърта позиция са от важно, дори критично значение за окупирането и активирането на NOP-рецептора, за разлика от класическите опиоидни рецептори (Guerrini et al., 2000b). При модификации на разстоянието между страничните вериги на тази аминокиселина в различните позиции (1 и 4), например при заместване със Nphe(1) в  $\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$  и  $\text{N}/\text{OFQ}(1-17)\text{NH}_2$ , а също и при такива, предизвикващи промени в пространственото ориентиране на  $\text{Phe}^1$ , се откриват чистия антагонист  $[\text{Nphe}^1]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$  (Calò et al., 1998b) и парциалния агонист

[Phe<sup>1</sup>ψ(CH<sub>2</sub>NH)Gly<sup>2</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, които позволяват да се охарактеризират и класифицират NOP-рецепторите в няколко животински вида. Именно изменението на биологичната активност в резултат на структурни промени от подобен характер, проучихме чрез втората серия производни на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>. Промените засягат аминокиселинната последователност в аминокрая Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>– или приетата за активираща (“message domain”) NOP-рецептора част на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>.

Много слабата биологична активност на съединенията от тази серия NOC\_1, NOC\_3 и NOC\_5 (в които Phe в първа позиция е заместена с CnAF с различна големина на циклоалкановия пръстен) в сравнение с N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, най-вероятно е резултат от взаимодействие предимно с класическите опиоидни рецептори и в по-малка степен (само във високите концентрации) с ноцицептиновите рецептори, тъй като стойностите за EC<sub>50</sub> и E<sub>max</sub> в присъствие и отсъствие на Nal (10<sup>-6</sup> M) се различават съществено. Потвърждение за това е също, че след преинкубиране на препаратите с NalBzOH (3.10<sup>-5</sup> M) ефектите от най-високите използвани концентрации на пептидите не се проявяват. Косвено потвърждение на нашите резултати са изследванията на Naydenova и съавт. (2010) и Bocheva и съавт. (2011), според които установеното от тях аналгетично действие на тези съединения се дължи на взаимодействие и с двата типа рецептори.

Допуснатата от нас възможност тези съединения да са антагонисти на NOP-рецепторите не се оправда. Получените данни от проведените от нас допълнителни изследвания с NOC\_3 доказват, че това съединение няма антагонистично действие, а е много слаб агонист.

Не може да се изключи и възможността слабото намаление на амплитудата на гладкомускулните съкращения на стимулирани с LEFS *vas deferens*, предизвикано от най-високите прилагани концентрации на изследваните съединения от тази група (1.10<sup>-7</sup> M – 1.10<sup>-5</sup> M), да е породено от действие върху постсинапсни структури или неспецифично действие върху гладките мускули.

По-слабите инхибиторни ефекти на съединенията от тази група в сравнение с N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> показват, че направените химични модификации в аминокиселинната последователност Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>– (“message domain”) на

N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> производните от тази група (NOC\_1, NOC\_3 и NOC\_5 ) водят до намаляване на биологичната активност, обуславят появата на афинитет към опиоидните рецептори и до голяма степен загуба на селективността към ноцицептиновите рецептори. От анализа на получените резултати, можем да приемем, че уголемяването на цикъла в заместителя не се отразява съществено на активността на новите аналози, което ни дава основание да допуснем, че не толкова големината на цикъла, колкото ароматният остатък на Phe<sup>1</sup> определя селективността на взаимодействие с ноцицептиновите рецептори. Като цяло, нашите резултати са в съгласие с публикуваното от Salvadori и съавт. (1999), че Phe в първа позиция на полипептидната верига определя афинитета към NOP-рецептора.

Изследванията на съединенията NOC\_2, NOC\_4 и NOC\_6, при които CnAF с различна големина на циклоалкановия пръстен са свързани към Phe в първа позиция от пептидната верига, показват, че те притежават инхибиторно действие (близко до това на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>) върху електрически предизвиканите съкращения на гладки мускули, без тази активност да е свързана с класическите опиоидни рецептори, тъй като не се наблюдават съществени разлики в инхибиторните ефекти на съединенията от тази група, когато са прилагани самостоятелно или след преинкубиране на гладкомускулните препарати с опиоидния блокер Nal (1.10<sup>-6</sup> M). Те, за разлика от NOC\_1, NOC\_3 и NOC\_5, остават селективни агонисти за NOP-рецепторите.

Внедряването на допълнителен обемен, цикличен заместител, свързан към Phe<sup>1</sup>, при съединения NOC\_2 и NOC\_4 би могло да бъде причината за по-ниската активност на тези съединения в сравнение с N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, вследствие влошаване на пространственото взаимодействие с активния център на NOP-рецепторите. Нашите резултати се подкрепят и от “структура-активност” проучванията на Reinscheid и съавт. (1996), които предполагат, че по-обемните групи в страничната верига в първа позиция на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> могат да възпрепятстват образуването на предпочитаната вторична структура на пептидната верига. Неочаквано, обаче, съединение NOC\_6, с най-голям пръстен в CnAF, достига максималния ефект на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, но при десет пъти по-висока концентрация.

В заключение можем да кажем, че присъединяването на обемист, цикличен заместител към Phe в първа позиция не променя селективността на новите производни, докато заместването ѝ с CnAF (с различен брой атоми в циклоалкановия пръстен - пет, седем или осем) е свързано със загуба на биологична активност при NOC\_1, NOC\_3 и NOC\_5 и поява на афинитет към класическите опиоидни рецептори. Следователно, заместването на аминокиселината Phe<sup>1</sup> намалява силата, ефективността и селективността на новите аналози на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> към ноцицептиновите рецептори.

Представеното в обзора съпоставяне на литературни данни, както и резултатите от нашите експерименти, показват, че дължината на основната пептидна верига на ноцицептина е от съществено значение за свързването и активирането на рецепторите му. Установено е, че вериги с по-малко от шест аминокиселини са неактивни (Bigoni et al., 1999). През 1997г., Dooley и съавт. доказват, че аминокиселинната последователност Ac-Arg-Tyr-Tyr- (Ac-RYY-) за първите три позиции от молекулата на късоверижните NOP-рецепторни лиганди е най-ефикасна. Въпреки минималната структурна прилика с ноцицептина, синтетичният хексапептид Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> е една от най-използваните матрици за синтез на нови лиганди за NOP-рецептора, защото съдържа аминокиселинна последователност, определяща висок афинитет и селективност към ноцицептиновия рецептор (изследвания върху *vas deferens* на Mason et al., 2001), както и висока инхибиторна ефективност върху електрически предизвикани гладкомускулни съкращения (Ho et al., 2000).

В резултат на „структура-активност” изследванията на различни автори са получени известен брой модифицирани в аминокрая хексапептидни аналози на Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> с различна активност. Например, съдържащи пентаноилов остатък в N-края производни на Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> запазват много висок рецепторен афинитет и имат значително променена вътрешната активност (Judd et al., 2003). Обратно, при нашите изследвания, получените в резултат от модифицирането също в тази част на молекулата на Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> с CnAF (съдържащи 5-, 7- или 8-атомен циклоалканов пръстен) аналози (от третата серия нови лиганди за NOP-рецептора - съединения 3, 4, 5 и 6) притежават понижен афинитет към NOP-

рецептора. Подобни резултати получават също Gündüz и сътрудници (2006), които при проучванията си върху “структура-активност” на модифицирани в N-края с други органично-молекулни остатъци (пивалоилов, формилов, бензоилов, мезилов) хексапептиди, потвърждават, че Arg<sup>1</sup> е предпочитана и дори “критична” аминокиселина. Нещо повече — установено е, че и двата аминокиселинни остатъка Arg<sup>1</sup> и Arg<sup>4</sup> от хексапептидната верига са необходими за проява на афинитет (Judd et al. 2004). Нашите резултати са в съответствие с литературните данни, че наличието на Arg в първа позиция от пептидната верига се изисква за запазване на афинитета и селективността към NOP-рецептора, след като заместването на Arg<sup>1</sup> с CnAF при съединение 3 води до загуба на афинитет към ноцицептиновите рецептори. Може да се предположи, че наблюдаваното слабо инхибиране на гладкомускулните съкращения от съединение 3 не е вследствие на взаимодействие с ноцицептиновия рецептор, защото ефектът му не се проявява в присъствие на Nal (10<sup>-6</sup> M), но не се повлиява и от NalBzOH (3.10<sup>-5</sup> M) и следователно, най-вероятно това съединение е агонист за класическите опиоидни рецептори. При другите две съединения 4 и 6, наличието или липсата на активност към класическите опиоидни рецептори не може да се коментира, тъй като те практически не проявяват ефект върху гладкомускулните съкращения в прилаганите концентрации, както и разлики между кумулативните “концентрация-отговор” криви, в присъствието или отсъствието на блокерите Nal (10<sup>-6</sup> M) и NalBzOH (3x10<sup>-5</sup> M). Може да се отбележи единствено факта, че нарастването на пръстена в заместителя повлиява в неблагоприятна посока биологичната активност на новите съединения.

От нашите резултати може да се направи заключението, че заместването на Arg в първа позиция от пептидната верига на Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> с 1-(метоксифосфоно)метиламиноциклоалкан карбоксилни киселини намалява N/OFQ-подобната активност на новосинтезираните аналози.

Една от поставените задачи бе да се установи дали биологичната активност, наблюдавана при изследвания върху относително опростената система на изолирани органи, се проявява и върху цял организъм, където множеството сложни регулаторни механизми могат да променят значително и дори да елиминират наблюдаваните *in vitro* ефекти.

Разграждащите ноцицептина ензими (главно аминокептидаза N и ендопептидаза 24.15) атакуват връзките Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>; Ala<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>; Ala<sup>11</sup>-Arg<sup>12</sup>; Arg<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup> (Montiel et al., 1997), при което се получават неактивни и/или слабо активни метаболити с различна продължителност на действие, в зависимост от вида на изследвания препарат (Suder et al., 1999; Vlaskovska et al., 1999; Terenius et al., 2000). Логично е да се предположи, че при еднакви експериментални условия разграждането на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и структурните му аналози би следвало да се извършва по еднакъв механизъм, поради минималните структурни различия между тях. Тъй като единствената разлика в структурата на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> е по-късата странична верига на аминокиселината в девета позиция, ние допуснахме, че трите пептида следва да се метаболизират от едни и същи ензими. Поради това, очаквахме N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> да имат сходни по своя характер ефекти *in vivo* върху предизвиканото с CG остро възпаление, подобно на ефектите им върху гладки мускули. Противоположно на това, обаче, при еднакви експериментални условия двата пептида показват различия във времето на развитие на инхибиторния си ефект. Изненадващо, в нашите изследвания [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, инжектиран 15 мин. преди CG, потиска трайно (през цялото време до края на опита) развитието на отока, но при едновременно инжектиране с CG не повлиява възпалителния процес след 120-та минута (обема на лапата не се различава от този на контролите). Докато за разлика от него, N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> потиска предизвикания с CG оток, само когато е инжектиран едновременно с CG. Структурният аналог [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> по характера на своя ефект наподобява този на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>: инжектиран едновременно с CG, потиска (но в по-слаба степен) развитието на едема, а инжектиран 15 мин. преди CG, го увеличава, но повече отколкото N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>.

Обобщено, резултатите от експериментите с N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, инжектирани едновременно или 15 минути преди CG, показват разлики в ефектите им, не само по характер, но и по динамика, върху предизвиканото с карагенов периферно възпаление.

Тъй като метаболизмът на ноцицептина е времезависим (Montiel et al., 1997), последователно образуващите се фрагменти с различна дължина и активност е

възможно да се различават по йонните взаимодействия на базичните аминокиселини и/или конформационно-свързания достъп на чувствителните към ензимното действие връзки до активния център на разграждащите ензими. Това разграждане би могло да бъде по-бързо за N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (инжектиран едновременно с CG), отколкото за [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> или [Dab<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>. Възможно е [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (или негови фрагменти) да взаимодействат по-бавно с NOP-рецепторите, което да обясни по-бързия ефект на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (приложен едновременно с CG) и “закъснения” във времето ефект на [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (по-бавното настъпване и по-продължителния модулиращ ефект при инжектиране 15 мин. преди CG).

Наблюдаваният от нас по-продължителен противовъзпалителен ефект на [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> добре корелира с получените от Terenius и съавт. (2000) данни, че по-късите N-терминални фрагменти са способни да блокират освобождаването на SP от окончанията на първичните сетивни С-неврони.

От друга страна, въвеждането на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> преди предизвикването на възпаление показва липса на ефект от 0-120 мин., следователно в условия *in vivo* N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> няма протективно или значимо проинфламаторно действие. Тенденцията за увеличение (статистически недостоверно) на отока след 120-та мин. би могла да е следствие на вторично отделяне на хистамин и други проинфламаторни медиатори под действието на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (Kimura et al., 2000; Tekes et al., 2006; Zhang et al., 2006). Същата липса на ефект при претретиране с N/OFQ е наблюдавана от Sun и сътр. през 2004 г. при предизвикано с пчелна отрова увеличение на обема на лапа от плъх.

Следователно, могат да се допуснат следните възможни механизми за действието на изследваните пептиди върху периферното възпаление:

1. Потискане на неврогенната компонента на възпалителния процес или
2. Повлияване на образуването на свободни радикали.

Независимо от времето на прилагане, успоредни изследвания в лабораторията “Свободно-радикални процеси“ (ИНБ) показват, че нито N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, нито [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> модулират предизвиканите от CG промени в антиоксидантния статус на тъканни хомогенати от лапите. От това следва да се

предположи, че механизмът на действие на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> не е свързан с повлияване на свободно-радикалните процеси.

От систематизираните тук резултати може да се направи заключението, че N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> въведен *in vivo* едновременно с CG, а [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> въведен 15 мин. преди CG, потискат развитието на възпалителния процес, като най-вероятно въздействието им е предимно върху неврогенната компонента на карагенановото възпаление. Основание за такова заключение дават и цитираните литературни данни (Helyes et al., 1997), според които ноцицептинът повлиява неврогенното възпаление (при друг експериментален модел) чрез инхибиране на освобождаването на SP и CGRP от терминалите на сетивните неврони, без да повлиява неневрогенната компонента.

Резултатите, получени от изследванията върху взаимодействието на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и структурния му аналог [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> с TRPV1-рецепторите и връзката им с канабиноидната система при карагенанов модел на остро възпаление, ни дават основание да направим следните изводи:

1. N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> осъществяват своето противовъзпалително действие чрез взаимодействие със собствени рецептори, разположени върху първичните сетивни неврони.

2. Ванилоидните рецептори не участват в реализирането на противовъзпалителното действие на ноцицептиновите агонисти N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и структурния му аналог [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>.

3. Едновременното инжектиране на животните с канабиноидни (HU-210) и ноцицептинови агонисти (N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> или [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>) не потенцира противовъзпалителното действие (в сравнение със самостоятелното им прилагане). Общото им въвеждане има адитивен ефект.

4. Съществува функционална връзка между NOP- и CB<sub>1</sub>-рецепторите. За реализиране на ефектите на ноцицептиновите агонисти N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и неговия структурен аналог [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> върху остро периферно възпаление са необходими свободни или активирани канабиноидни CB<sub>1</sub>-рецептори, защото след блокиране на CB<sub>1</sub>-рецепторите с AM251 инхибиторния им ефект върху възпалението не се проявява. Освен това, въвеждането на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и



[O<sup>m</sup>]<sup>9</sup>N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> на този фон предизвиква по-голям оток, в сравнение със стойностите, достигани в контролната група в същите времеви интервали. Това логично може да се обясни с отделянето на хистамин и други проинфламаторни медиатори от мастоцитите под действие на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, което е установено в кожа и перитонеум от (Kimura и съавт. 2000), а също и в мозък (Tekes и съавт. 2006).

5. Проявата на противовъзпалителни ефекти на канабиноидния агонист HU-210 не зависи от функционалното състояние на ноцицептиновите рецептори.

Досега, в достъпната ни литература съществуват много малко изследвания относно вероятната връзка между канабиноидните CB<sub>1</sub>- и NOP-рецепторите *in vivo*. Изводите се затрудняват силно и от различните механизми, по които отделните агонисти и антагонисти на канабиноидните рецептори осъществяват ефектите си. Например, активирането на CB<sub>1</sub>-рецепторите от ендогенния канабиноид анандамид намалява активността на TRPV1-рецепторите в първичните сетивни неврони (Kim et al., 2007), докато WIN 55,212-2 (смесеният CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>-рецепторен агонист) предизвиква хипотермия по механизъм, невключващ участието на TRPV1-рецепторите (Mahmud et al., 2009). Изследвайки ефектите на NOP-рецепторния антагонист JTC-801 върху предизвиканата при централно въвеждане на канабиноиди хипотермия у плъхове, Rawls и съавт. (2007) установяват, че той силно понижава предизвиканата от CB<sub>1</sub>-агонисти хипотермия. Според тях, активирането на NOP-рецепторите е предварително условие, за да се реализира хипотермичното действие на канабиноидите. Получените от нас резултати при използвания модел и периферно приложение, ни дават основание да заключим точно обратното: че при тези условия, ноцицептиновият ефект се опосредства от активирани или свободни CB<sub>1</sub>-рецептори. Съпоставянето на изводите от тези две работи ни позволява да потвърдим функционалната връзка между ноцицептиновата и канабиноидна система, като крайният резултат от това взаимодействие силно зависи от модулираната функция и мястото на действие – централна нервна система или периферия.

## VI. Изводи

1. При използваните *in vitro* експериментални условия, N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> и новосинтезираните им аналози понижават в различна степен амплитудата на предизвиканите с LFES гладкомускулни съкращения на изолирани простатични сегменти от *vas deferens* на плъх, без да променят мускулния тонус.

2. Модифицираните с Orn, Dab или Dar в позиция девет и/или тринадесет производни на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> осъществяват ефектите си чрез селективно взаимодействие с NOP-рецепторите.

3. Аминокиселината Lys в позиции девет и тринадесет от пептидната верига на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> е от съществено значение за биологичната му активност:

3.1. Скъсяването на дължината на страничната верига на Lys с една –CH<sub>2</sub> група, в позиция девет от пептидната верига на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, води до засилване на биологичната активност;

3.2. Противоположно на това, подобно скъсяване в позиция тринадесет, както и едновременно в позиции, девет и тринадесет или скъсяване с повече от една –CH<sub>2</sub> група, води до изразено отслабване на агонистичната активност и ефективността на новосинтезираните аналози на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>. Това най-вероятно се дължи на измененото разстояние между основната пептидна верига и активния център на рецептора.

4. Аминокиселините Phe или Arg в първа позиция от пептидната верига, съответно на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> или Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>, имат важна роля за биологичната им активност:

4.1. Наличието на аминокиселините Phe<sup>1</sup> и Arg<sup>1</sup> определя селективността към NOP-рецепторите, а отстраняването им води до поява на активност към класическите опиоидни рецептори;

4.2. Заместването на Phe или Arg в първа позиция на тези вериги съответно с SpAF (съдържащи 5-, 7- или 8-атомен циклоалканов пръстен), води до понижаване на афинитета, ефективността и селективността на новите аналози към NOP-рецепторите и поява на активност към класическите опиоидни рецептори;

4.3. Внедряването на обемен цикличен заместител към Phe или Arg в първа позиция от пептидната верига, съответно на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> или Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>, за разлика от заместването им, не води до загуба на селективността на новите аналози към NOP-рецепторите.

5. При използваните *in vivo* експериментални условия, N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и структурният му аналог [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> потискат неврогенната компонента на острия възпалителен процес, без да проявяват про- или антиоксидантни свойства.

5.1. Съществува функционална връзка между NOP- и CB<sub>1</sub>-рецепторите, която не се медира от ванилоидните (TRPV1) рецептори при модел на предизвикано с карагеноан остро периферно възпаление;

5.2. Най-вероятно, N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> осъществяват своето противовъзпалително действие чрез взаимодействие със собствените си NOP-рецептори, разположени върху първичните сетивни неврони;

5.3. Наличието на активирани или свободни канабиноидни CB<sub>1</sub>-рецептори е условие, за да се реализират инхибиторните ефекти на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> при използвания експериментален модел.

## VII. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път е изследвано как се променя биологичната активност на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> при последователното скъсяване на дължината на страничната верига на Lys в позиции девет и/или тринадесет от пептидната му верига. Установено е, че заместването на аминокиселината Lys със структурните ѝ аналози Orn, Dab или Dar води до промяна на афинитета и ефективността на новосинтезираните аналози, но не и на селективността им към NOP-рецепторите.

2. За първи път са получени данни за биологичната активност на пептидни аналози на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>, съдържащи в аминокрая CnAF (с 5-, 7- или 8-атомен пръстен). Установено е, че новите съединения потискат в различна степен предизвиканите с LFES гладкомускулни съкращения на *vas deferens* от плъх. Потвърдено е значението на аминокиселините Phe и Arg в първа позиция от тези пептидни вериги за запазване на селективността и ефективността им.

3. Получени са оригинални данни в подкрепа на хипотезата, че N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и структурният му аналог [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> потискат неврогенната компонента на острия възпалителен процес в периферията.

4. Установено е, че ванилоидните (TRPV1) рецептори не участват в механизма на противовъзпалителното действие на N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> при модел на остро, предизвикано с карагенан периферно възпаление, като е показано, че ефектите на изследваните пептиди не се променят след блокиране на TRPV1-рецепторите.

5. Доказано е съществуването на функционална връзка между NOP-рецептора и канабиноидните CB<sub>1</sub>-рецептори при модел на остро, предизвикано с карагенан периферно възпаление, като за първи път е показано, че инхибиторният ефект на изследваните пептиди не се проявява след блокиране на CB<sub>1</sub>-рецепторите.

## VIII. ПРИЛОЖЕНИЯ

### 8.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Zamfirova R., Tzvetanova E., Aleksandrova A., Petrov L., **Mateeva P.**, Pavlova A., Kirkova M., Todorov S. (2009) *In vivo* effects of N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> and its structural analogue [ORN<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> on carrageenan-induced inflammation: rat-paw oedema and antioxidant status. *Central European Journal of Biology*, 4(2), 170-178. **IF=0,915**
2. Naydenova E., Todorov P., **Mateeva P.**, Zamfirova R., Pavlov N., Todorov S. (2010) Synthesis and biological activity of novel small peptides with aminophosphonates moiety as NOP receptor ligands. *Amino Acids*, 39(5), 1537-1543. **IF=4,106**
3. **Mateeva P.**, Zamfirova R., Pajpanova T., Naydenova E., Vezekov L. (2011) Changes in the biological activity of N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> after substitution of Lys<sup>9</sup> by canavanine, Dab and Dap. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 64(11), 1645-1650. **IF=0,210**
4. **Mateeva P.**, Zamfirova R. (2013) Involvement of vanilloid- and cannabinoid receptors in the anti-inflammatory action of nociceptin. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 66(2), 273-280. **IF=0,210 (2011)**

## 8.2. НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Zamfirova R., Jivkova V., Naydenova E., **Mateeva P.**, Todorov S. (2006) Structure-activity relationship studies on modified nociceptin analogues. *29<sup>th</sup> Balkan Medical Week "Ecology, Man, Health"*, September 28-29, 2006, Golden Sands – Varna, Bulgaria, p. 97.
2. **Mateeva P.I.**, Petrov L., Tzvetanova E., Pavlova A., Kirkova M. and Zamfirova R. (2008) Effects of nociceptin and [Orn<sup>9</sup>]nociceptin on carrageenan-induced inflammation in rat paw. *V<sup>th</sup> Bulgarian Peptide Symposium*, May 28-30, 2008, Blagoevgrad (Bachinovo), Bulgaria, p. 60.
3. Petrov L., Tzvetanova E., Pavlova A., **Mateeva P.**, Kirkova M. and Zamfirova R. (2008) Effects of nociceptin and its structural analogue [Orn<sup>9</sup>]nociceptin on markers of oxidative stress in blood and liver of rats with acute carrageenan-induced paw oedema. *V<sup>th</sup> Bulgarian Peptide Symposium*, May 28-30, 2008, Blagoevgrad (Bachinovo), Bulgaria, p. 38.
4. **Mateeva P.**, Zamfirova R., Todorov P., Pavlov N., Naydenova E., Todorov S. (2009) Biological activity of novel hexapeptide derivatives synthesized with  $\alpha,\alpha$ -disubstituted cyclic amino phosphonates. *VI National Congress of Pharmacology*, October 2009, Varna, Bulgaria, p. 36.
5. **Mateeva P.**, Zamfirova R., Todorov P., Naydenova E. (2011) Biological activity of novel peptides as nociceptin-receptor ligands. *4<sup>th</sup> International Congress of Molecular Medicine*, June 27-30, 2011, Istanbul, Turkey, 196, p. 541.
6. Zamfirova R., Todorov P., **Mateeva P.**, Pavlov N., Naydenova E. (2011) Synthesis and biological activity of novel hexapeptides with aminophosphonates moiety as nociceptin receptor ligands. *4<sup>th</sup> International Congress of Molecular Medicine*, June 27-30, 2011, Istanbul, Turkey, 283, p. 573.
7. **Mateeva P.**, Todorova P. Are cannabinoid and vanilloid receptors involved in the anti-inflammatory action of N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> and [Orn<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>: In vivo effects on carrageenan-induced rat-paw inflammation? *VI<sup>ma</sup> работна среща "Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти"*, 2011, 28-30 ноември, София, България, p. 53.

### 8.3. ЦИТИРАНИЯ НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД (ДО М. МАЙ, 2013 Г.)

Zamfirova R., Tzvetanova E., Alexandrova A., Petrov L., Mateeva P., Pavlova A., Kirkova M., Todorov S.

**In vivo effects of N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> and its structural analogue [ORN<sup>9</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> on carrageenan-induced inflammation: Rat-paw oedema and antioxidant status**

2009, *Central European Journal of Biology*, 4(2), 170-178

1. Karakus E., Halici Z., Albayrak A., Bayir Y., Aydin A., Unal D., Cadirci E., Ferah I. Odaci, E. 2013. Beneficial Pharmacological Effects of Levosimendan on Antioxidant Status of Acute Inflammation Induced in Paw of Rat: Involvement in Inflammatory Mediators. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 112(3): 156-163.

Naydenova E.D., Todorov P.T., Mateeva P.I., Zamfirova R.N., Pavlov N.D., Todorov, S.B.

**Synthesis and biological activity of novel small peptides with aminophosphonates moiety as NOP receptor ligands**

2010, *Amino Acids*, 39(5), 1537-1543

1. Bodnar R.J. Endogenous opiates and behavior: 2010. 2011. *Peptides* 32(12): 2522-2552.
2. Abdel-Megeed M.F., Badr B.E., Azaam M.M., El-Hiti G.A. 2012. Synthesis, antimicrobial and anticancer activities of a novel series of diphenyl 1-(pyridin-3-yl)ethylphosphonates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 20(7): 2252-2258.
3. Abdel-Megeed M.F., Badr B.E., Azaam M.M., El-Hiti G.A. 2012. Synthesis and antimicrobial activities of a novel series of heterocyclic  $\alpha$ -aminophosphonates. *Archiv der Pharmazie* 345(10): 784-789.
4. Abdel-Megeed M.F., Badr B.E., Azaam M.M., El-Hiti G.A. 2012. Synthesis and antimicrobial activities of Diphenyl(Arylamino)(1-Phenyl-3- (Pyridin-2-Yl)-1 H - Pyrazol-4-Yl)Methylphosphonates. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements* 187(12): 1462-1468.
5. Kril A., Topashka-Ancheva M., Iliev I., Gerasimova T., Kraicheva I., Tsacheva I., Vodenicharova E., Troev K. 2012. In vitro antitumour activity, genotoxicity, and antiproliferative effects of aminophosphonic acid diesters and their synthetic precursors. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 67 C(9-10): 473-480.

6. Abdel-Megeed M.F., Azaam M.M., El-Hiti G.A. 2013. Diphenyl (4'-(Aryldiazenyl)biphenyl-4-ylamino)(pyridin-3-yl) methylphosphonates as Azo disperse dyes for dyeing polyester fabrics. *Journal of Chemistry* art. no. 308419.
7. Reddy N.B., Sundar Ch.S., Rani Ch.R., Rao K.U.M., Nayak S.K., Cirandur Suresh Reddy C.S. Triton X-100 catalyzed synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonates. *Arabian Journal of Chemistry* Available online 31 July 2011; In Press, Corrected Proof <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.07.025>



## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Amano T., Matsubayashi H., Tamura Y., Takahashi T., Orphanin FQ-induced outward current in rat hippocampus, *Brain Res.*, 2000, 853(2): 269-274.
2. Ambo A., Kohara H., Kawano S., Sasaki Y., Opioid receptor-like 1 (ORL1) receptor binding and the biological properties of Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Arg-NH<sub>2</sub> and its analogs, *J. Pept. Sci.*, 2007, 13(10): 672-678.
3. Anton B., Fein J., To T., Li X., Silberstein L., Evans C.J., Immunohistochemical localization of ORL1 in the central nervous system of the rat, *J. Comp. Neurol.*, 1996, 368: 229-251.
4. Ardati A., Henningsen R.A., Higelin J., Reinscheid R.K., Civelli O., Monsma F.J. Jr., Interaction of [<sup>3</sup>H]orphanin FQ and <sup>125</sup>I-Tyr<sup>14</sup>-orphanin FQ with the orphanin FQ receptor: kinetics and modulation by cations and guanine nucleotides, *Mol. Pharmacol.*, 1997, 51: 816-824.
5. Arduin M., Spagnolo B., Calò G., Guerrini R., Carra' G., Fischetti C., Trapella C., Marzola E., McDonald J., Lambert D., Regoli D., Salvadori S., Synthesis and biological activity of nociceptin/orphanin FQ analogues substituted in position 7 or 11 with  $\alpha,\alpha$ -dialkylated amino acids, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, 15: 4434-4443.
6. Armstead W.M., Nociceptin/orphanin FQ dilates pial arteries by K(ATP) and K(ca) channel activation, *Brain. Res.*, 1999, 835: 315-323.
7. Askari N., Mahboundi F., Haeri-Rohani A., Kazemi B., Sarrami R., Edalat R., et al., Effects of single administration of morphine on G-protein mRNA level in the presence and absence of inflammation in the rat spinal cord, *Scand. J. Immunol.*, 2008, 67: 47-52.
8. Balamurugan M., Parthasarathi K., Cooper E.L., Ranganathan L.S., Earthworm paste (*Lampito mauritii*, Kinberg) alters inflammatory, oxidative, haematological and serum biochemical indices of inflamed rat, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2007, 11: 77-90.
9. Barnes T.A., Lambert D.G., Nociceptin/orphanin FQ peptide-receptor system: are we any nearer the clinic?, *Br. J. Anaesth.* 2004, 93: 626-628.
10. Berger H., Albrecht E., Wallukat G., Bienert M., Antagonism by acetyl-RYYRIK-NH<sub>2</sub> of G protein activation in rat brain preparations and of chronotropic effect on rat cardiomyocytes evoked by nociceptin/orphanin FQ, *Br. J. Pharmacol.*, 1999, 126: 555-558.
11. Berger H., Bigoni R., Albrecht E., Richter R.M., Krause E., Bienert M., Calò G., The nociceptin/orphanin FQ receptor ligand acetyl-RYYRIK-amide exhibits antagonistic and agonistic properties, *Peptides*, 2000, 21: 1131-1139.

12. Bigoni R., Calò G., Mitri S., Regoli D., Naloxone benzoylhydrazone acts as a non-selective nociceptin receptor antagonist, *Fundman Clin. Pharmacol.*, 1999a, 13: 214s.
13. Bigoni R., Giuliani S., Calò G., Rizzi A., Guerrini R., Salvadori S., Regoli D., Maggi C.A., Characterization of nociceptin receptors in the periphery: in vitro and in vivo studies, *Naunyn. Schm. Arch. Pharmacol.*, 1999b, 359: 160-167.
14. Bigoni R., Calò G., Rizzi A., Guerrini R., De Risi C., Hashimoto Y., Hashiba E., Lambert D.G., Regoli D., In vitro characterization of J-113397, a non-peptide nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist, *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 2000, 361(5): 565-568.
15. Bigoni R., Rizzi D., Rizzi A., Camarda V., Guerrini R., Lambert D.G., Hashiba E., Berger H., Salvadori S., Regoli D., Calò G., Pharmacological characterisation of [(pX)Phe<sup>4</sup>]nociceptin(1-13)amide analogues. 1. In vitro studies, *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 2002, 365(6): 442-449.
16. Biondi B., Goldin D., Giannini E., Lattanzi R., Negri L., Melchiorri P., Ciocca L., Rocchi R., Novel Nociceptin Analogues: Synthesis and Biological Activity, *Inter. J. Peptide Res. Ther.*, 2006, 12: 139-144.
17. Black P.H., Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation, *Brain Behav. Immun.*, 2002, 16(6): 622-653.
18. Bocheva A.I., Dzhambazova E.B., Todorov P.T., Pavlov N.D., Naydenova E.D., Effects of naloxone and JTC-801 on analgesic activity of novel N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> analogues, *Proceedings of the 22<sup>nd</sup> American Peptide Symposium*, American Peptide Society, 2011.
19. Brain S.D. and Cox H.M., Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets, *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 147, 202-211.
20. Brock S.C. and Tonussi C.R., Intrathecally injected morphine inhibits inflammatory paw edema: the involvement of nitric oxide and cyclic-guanosine monophosphate, *Anesth. Analg.*, 2008, 106: 965- 971.
21. Brookes Z.L., Stedman E.N., Guerrini R., Lawton B.K., Calò G., Lambert D.G., Pro-inflammatory and vasodilator effects of N/OFQ/orphanin FQ (N/OFQ) in the rat mesenteric microcirculation are mediated by histamine, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2007, 93: H2977-H2985.
22. Brown K.A., Brain S.D., Pearson J.D., Edgeworth J.D., Lewis S.M., Treacher D.F., Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis, *Lancet*, 2006, 368: 157-169.
23. Bucher B., ORL<sub>1</sub> receptor-mediated inhibition by nociceptin of noradrenalin release from perivascular sympathetic nerve endings of the rat tail artery, *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 1998, 358:682-685.
24. Bunzow J.R., Saez C., Mortrud M., Bouvier C., Williams J.T., Low M., Grandy D.K., Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat

- opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type, *FEBS Lett.*, 1994, 347, 284-288.
25. Butour J., Moisant C., Mazarguil H., Mollereau C., Meunier J., Recognition and activation of the opioid receptor-like ORL1 receptor by nociceptin, nociceptin analogs and opioids, *Eur. J. Pharmacol.*, 1997, 321: 97-103.
  26. Butour J.L., Moisant C., Mollereau C., Meunier J.C., [Phe<sup>1</sup>psi(CH<sub>2</sub>-NH)Gly<sup>2</sup>]-nociceptin-(1-13)NH<sub>2</sub> is an agonist of the nociceptin (ORL1) receptor, *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, 349(1): R5-R6.
  27. Calò G., Rizzi A., Bigoni G., Neugebauer V., Salvadori S., Guerrini R., Bianchi C., Regoli D., The mouse vas deferens: a pharmacological preparation sensitive to nociceptin, *Eur. J. Pharmacol.*, 1996, 311(1): R3- R5.
  28. Calò G., Rizzi A., Bodin M., Neugebauer W., Salvadori S., Guerrini R., Bianchi C., Regoli D., Pharmacological characterization of nociceptin receptor: an in vitro study. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1997, 75: 713-718.
  29. Calò G., Rizzi A., Marzola G., Guerrini R., Salvadori S., Beani L., Regoli D., Bianchi C., Pharmacological characterization of the nociceptin receptor mediating hyperalgesia in the mouse tail withdrawal assay, *Br. J. Pharmacol.*, 1998a, 125(2): 373-378.
  30. Calò G., Guerrini R., Bigoni R., Rizzi A., Regoli D., Salvadori S., Structure-activity study of the Nociceptin(1-13)-NH<sub>2</sub> N-terminal tetrapeptide and discovery of a nociceptin receptor antagonist, *J. Med. Chem.*, 1998b, 41(18): 3360-3366.
  31. Calò G., Guerrini R., Rizzi A., Salvadori S., Regoli D., Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target, *Br. J. Pharmacol.*, 2000a, 129, 1261-1283.
  32. Calò G., Guerrini R., Bigoni R., Rizzi A., Marzola G., Okawa H., Bianchi C., Lambert D.G., Salvadori S., Regoli D., Characterization of [Nphe(1)]nociceptin(1-13)NH(2), a new selective nociceptin receptor antagonist, *Br. J. Pharmacol.*, 2000b, 129(6): 1183-1193.
  33. Calò G., Bigoni R., Rizzi A., Guerrini R., Salvadori S., Regoli D., Nociceptin/orphanin FQ receptor ligands, *Peptides*, 2000c, 21(7): 935-947.
  34. Calò G., Rizzi A., Bigoni R., Guerrini R., Salvadori S., Regoli D., Pharmacological profile of nociceptin/orphanin FQ receptors, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2002a, 29(3): 223-228.
  35. Calò G., Rizzi A., Rizzi D., Bigoni R., Guerrini R., Marzola G., Marti M., McDonald J., Morari M., Lambert D.G., Salvadori S., Regoli D., [Nphe1,Arg14,Lys15]nociceptin-NH<sub>2</sub>, a novel potent and selective antagonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor, *Br. J. Pharmacol.*, 2002b, 136(2): 303-311.
  36. Carra' G., Calò G., Spagnolo B., Guerrini R., Arduin M., Marzola E., Trapella C., Regoli D., Salvadori S., Tryptophan replacement in the nociceptin/orphanin FQ receptor ligand Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>, *J. Pept. Res.*, 2005, 66(1): 39-47.

37. Carvalho D., Petronilho F., Vuolo F., Machado R.A., Constantino L., Guerrini R., Calo G., Gavioli E.C., Streck E.L., Dal-Pizzol F., The nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor antagonist effects on an animal model of sepsis, *Intensive Care Med.*, 2008, 34(12): 2284-2290.
38. Costa B., Colleoni M., Conti S., Parolaro D., Franke Ch., Trovato A.E., Giagnoni G., Oral anti-inflammatory activity of cannabinal, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw, *Naun. Schmied. Arch. Pharmacol.*, 2004, 369(3): 294-299.
39. Champion H.C., Wang R., Hellstrom W.J., Kadowitz P.J., Nociceptin, a novel endogenous ligand for the ORL1 receptor, has potent erectile activity in the cat, *Am. J. Physiol.*, 1997, 273: E214–E219.
40. Champion H.C. and Kadowitz P.J., [Tyr1]-nociceptin, a novel nociceptin analog, decreases systemic arterial pressure by a naloxone-insensitive mechanism in the rat, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997a, 234: 309–312.
41. Champion H.C. and Kadowitz P.J., [Tyr1]-nociceptin has naloxone-insensitive vasodilator activity in the hindquarters vascular bed of the rat, *Life Sci.*, 1997b, 61: 403–408.
42. Chen Y., Mestek A., Liu J., Hurley J.A., Yu L., Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain, *Mol. Pharmacol.*, 1993, 44: 8-12.
43. Chen L.X., Wang Z.Z., Wu H., Fang Q., Chen Y., Wang R., Effects of nociceptin (1-13) in pain modulation at supraspinal level in mice, *Neurosc. Lett.*, 2002, 331(2): 95-98.
44. Chen Y., Sommer C., Activation of the nociceptin opioid system in rat sensory neurons produces antinociceptive effects in inflammatory pain: involvement of inflammatory mediators, *J. Neurosci. Res.*, 2007, 85(7): 1478-1488.
45. Chiou L.C., Differential antagonism by naloxone benzoylhydrazone of the activation of inward rectifying K<sup>+</sup> channels by nociceptin and  $\mu$ -opioid in rat periaqueductal grey slices, *Naun. Schmied. Arch. Pharmacol.*, 2001, 363: 383-389.
46. Chiou L.C., Liao Y.Y., Fan P.C., Kuo P.H., Wang C.H., Riemer C., Prinssen E.P., Nociceptin/orphanin FQ peptide receptors: pharmacology and clinical implications. *Curr. Drug Targets*, 2007, 8(1): 117-35.
47. Chou T.C., Anti-inflammatory and analgesic effects of paeonol in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia, *Br. J. Pharmacol.*, 2003, 139: 1146-1152.
48. Chu X., Xu N., Li P., Wang J.Q., Profound inhibition of cardiomotor neurons in the rat rostral ventrolateral medulla by nociceptin (orphanin FQ), *Neuroreport*, 1998, 9(6): 1081-1084.
49. Connor M., Vaughan C.W., Chieng B., Christie M.J., Nociceptin receptor coupling to a potassium conductance in rat locus coeruleus neurones in vitro, *Br. J. Pharmacol.*, 1996, 119: 1614–1618.

50. Connor M. and Christie M.J., Opioid receptor signaling mechanisms, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1999, 26: 493- 499.
51. Corbett A.D., Henderson G., McKnight A.T., Paterson S.J., 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail, *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 147, S1: 153-162.
52. Corboz M.R., Rivelli M.A., Egan R.W., Tulshian D., Matasi J., Fawsi A.B., Benbow L., Smith-Torhan A., Zhang H., Hey J.A., Nociceptin inhibits capsaicin-induced bronchoconstriction in isolated guinea-pig lung, *Eur. J. Pharmacol.*, 2000, 402: 171-179.
53. Cox B.M., Chavkin C., Christie M.J., Civelli O., Evans C., Hamon M.D., Hoell V, Kieffer B., Kitchen I., McKnight A.T., Meunier J.C., Portoghese PS, Opioid receptors. In *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*, 2<sup>nd</sup> ed. IUPHAR Media Ltd, London, 2000, 321–333.
54. Cuzzocrea S., Costantino G., Mazzson E., Zingarelli B., De Sarro A., Caputi A.P., Protective effects of Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP), a superoxide dismutase mimetic, in paw oedema induced by carrageenan in the rat, *Biochem. Pharmacol.*, 1999, 58: 171-176.
55. Cuzzocrea S., Mazzon E., Dugo L., Serraino I., Ciccolo A., Centorrino T., Protective effects of n-acetylcysteine on lung injury and red blood cell modification induced by carrageenan in the rat, *FASEB J.*, 2001, 15: 1187-1200.
56. Cuzzocrea S., Mazzon E., Sautebin L., Dugo L., Serraino I., De Sarro A., Protective effects of Celecoxib on lung injury and red blood cells modification induced by carrageenan in the rat, *Biochem. Pharmacol.*, 2002, 63: 785-795.
57. Darland T., Heinricher M.M., Grandy D.K., Orphanin FQ/nociceptin: a role in pain and analgesia, but so much more, *Trends Neurosci.*, 1998, 21(5): 215-21.
58. Davies B.G., Synthesis of glycoproteins, *Chem. Rev.*, 2002, 102: 579-601.
59. Devine D.P., Reinscheid R.K., Monsma F.J. Jr., Civelli O., Akil H., The novel neuropeptide orphanin FQ fails to produce conditioned place preference or aversion, *Brain Res.*, 1996, 727(1-2): 225-229.
60. Dhawan B.N., Cesselin F., Raghubir R., Reisine T., Bradley P.B., Portoghese P.S., Hamon M., International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors, *Pharmacol. Rev.*, 1996, 48: 567-592.
61. Dhawan B.N., Raghubir R., Hamon M., Opioid receptors. In *The IUPHAR compendium of receptor characterization and classification*, ed. Girdlestone, 1998, D. 218-226, London: IUPHAR Media Ltd.
62. Di Giannuario A., Pieretti S., Catalani A., Loizzo A., Orphanin FQ reduces morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens: a microdialysis study in rats, *Neurosci. Lett.*, 1999, 272: 183–186.
63. Di Giannuario A. and Pieretti S., Nociceptin differentially affects morphine-induced dopamine release from the nucleus accumbens and nucleus caudate in rats, *Peptides*, 2000, 21: 1125–1130.

64. Doi N., Dutia M.B., Russell J.A., Inhibition of rat oxytocin and vasopressin supraoptic nucleus neurons by nociceptin in vitro, *Neuroscience*, 1998, 84(3): 913-921.
65. Doggrel S.A., Cardiovascular and renal effects of nociceptin/orphanin FQ: a new mediator to target?, *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, 2007, 8(9): 742-749.
66. Dooley C.T. and Houghten R. A., Orphanin FQ: receptor binding and analog structure activity relationships in rat brain, *Life Sci.*, 1996, 59(1): 23-29.
67. Dooley C.T., Spaeth C.G., Berzetei-Gurske I.P., Craymer K., Adapa I. D., Brandt S. R., Houghtn R.A., Toll L., Binding and in vitro activities of peptides with high affinity for the nociceptin/orphanin FQ receptor, ORL1, *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997, 283: 735-741.
68. Dooley C.T. and Houghten R.A., New opioid peptides, peptidomimetics, and heterocyclic compounds from combinatorial libraries, *Biopolymers*, 1999, 51(6): 379-390.
69. Dooley C.T. and Houghten R.A., Orphanin FQ/nociceptin receptor binding studies, *Peptides*, 2000, 21(7): 949-960.
70. Du L.N., Wu G.C., Cao X.D., Modulation of orphanin FQ or electroacupuncture (EA) on immune function of traumatic rats, *Acupunct. Electro-Ther. Res.*, 1998, 23: 1-8.
71. Dzhambova E., Nocheva H., Bocheva A., Analgesic effects of some newly synthesized nociceptin analogues in rats, *Pharmacia*, 2008, 55: 30-33.
72. Elmes S.J., Winvard L.A., Medhurst S.J., Clavton N.M., Wilson A.W., Kendall D.A., Chapman V., Activation of CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors attenuates the induction and maintenance of inflammatory pain in the rat. *Pain*, 2005, 118(3): 327-335.
73. Emmerson P.J. and Miller R.J., Pre- and postsynaptic actions of opioid and orphan opioid agonists in the rat arcuate nucleus and ventromedial hypothalamus in vitro, *J. Physiol.*, 1999, 517( Pt 2): 431-445.
74. Evans C.J., Keith D.E., Jr, Morrison H., Magendzo K., Edwards R.H., Cloning of a delta opioid receptor by functional expression, *Science*, 1992, 258: 1952-1955.
75. Faisy C., Natile E., Rouget C., Risse P.-A., Guerot E., Fagon J.-Y., Chinet T., Roche N., Anvenier C., Nociceptin inhibits vanilloid TRPV-1-mediated neurosensitization induced by fenoterol in human isolated bronchi, *Naun. Schmied. Arch. Pharmacol.*, 2004, 370: 167-175.
76. Fiset M.E., Gilbert C., Poubelle P.E., Pouliot M., Human neutrophils as a source of N/OFQ: a novel link between pain and inflammation, *Biochemistry*, 2003, 42: 10498-10505.
77. Fisher A., Forssmann W.G., Udem B.J., Nociceptin-induced inhibition of tachykinergic neurotransmission in guinea pig bronchus, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998, 285: 901-907.

78. Florin S., Suaudeau C., Meunier J.C., Costentin J., Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice, *Eur. J. Pharmacol.*, 1996, 317(1): 9-13.
79. Fukuda K., Kato S., Mori K., Nishi M., Takeshima H., Iwabe N., Miyata T., Houtani T., Sugimoto T., cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family, *FEBS Lett.*, 1994, 343: 42-46.
80. Giuliani S. and Maggi C.A., Prejunctional modulation by nociceptin of nerve-mediated inotropic responses in guinea-pig left atrium, *Eur. J. Pharmacol.*, 1997, 332: 231-236.
81. Giuliani S., Tramontana M., Lecci A., Maggi C.A., Effect of nociceptin on heart rate and blood pressure in anaesthetized rats, *Eur. J. Pharmacol.*, 1997, 333(2-3): 177-179.
82. Giuliani S., Lecci A., Tramontana M., Maggi C.A., The inhibitory effect of nociceptin on the micturition reflex in anaesthetized rats, *Br. J. Pharmacol.*, 1998, 124(7): 1566-1572.
83. Giuliani S., Lecci A., Maggi C.A., Nociceptin and neurotransmitter release in the periphery, *Peptides*, 2000, 21(7): 977-984.
84. Guerrini R., Calò G., Rizzi A., Bianchi C., Lazarus L.H., Salvadori S., Temussi P.A., Regoli D., Address and message sequences for the nociceptin receptor: a structure-activity study of nociceptin-(1-13)-peptide amide. *J. Med. Chem.*, 1997, 40: 1789-1793.
85. Guerrini R., Calò G., Rizzi A., Bigoni R., Bianchi C., Salvadori S., Regoli D., A new selective antagonist of the nociceptin receptor, *Br. J. Pharmacol.*, 1998, 123: 163-165.
86. Guerrini A., Calò G., Bigoni R., Rizzi A., Varani K., Toth G., Gessi S., Hashiba E., Hashimoto Y., Lambert D.G., Further studies of nociceptin related peptides: discovery of a new chemical template with antagonist activity on the nociceptin receptor, *J. Med. Chem.*, 2000a, 43: 2805-2813.
87. Guerrini R., Calò G., Rizzi A., Bigoni R., Rizzi D., Regoli D., Salvadori S., Structure-activity relationships of nociceptin and related peptides: comparison with dynorphin A, *Peptides*, 2000b, 21(7): 923-933.
88. Gumusel B., Hao QZ, Hyman A., Chang J.K., Kapusta D.R., Lipton H., Nociceptin: An endogenous agonist for central opioid like(1) (ORL (1)) receptors possesses systemic vasorelaxant properties., *Life Sci.*, 1997, 60: 141-145.
89. Gündüz O., Sipos F., Kocsis L., Magiar A., Orosz G., Borsodi A., Calò G., Benyhe S., In vitro binding and functional studies of Ac-RYYRIK-ol and its derivatives, novel partial agonists of the nociceptin/orphanin F/Q receptor, *Neurosignals*, 2006a, 15(2): 91-101.
90. Gündüz O., Rizzi A., Baldisserotto A., Guerrini R., Spagnolo B., Gavioli E.C., Kocsis L., Magyar A., Benyhe S., Borsodi A., Calò G., In vitro and in vivo

- pharmacological characterization of the N/OFQ/orphanin FQ receptor ligand Ac-RYYRIK-ol, *Eur. J. Pharmacol.*, 2006b, 539: 39-48.
91. Halford W.P., Gebhardt B.M., Carr D.J., Functional role and sequence analysis of a lymphocyte orphan opioid receptor, *J. Neuroimmunol.*, 1995, 59(1-2): 91-101.
  92. Halici Z., Dengiz G.O., Odabasoglu F., Suleyman H., Cadirci E., Halici M., Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema, *Eur. J. Pharmacol.*, 2007, 566: 215-221.
  93. Hamon M., The new approach to opioid receptors, *NS Arch. Pharmacol.*, 1998, 358 (suppl 2), SA 5.3.
  94. Hantos M.B., Szalay F., Lakatos P.L., Hegedus D., Firneisz G., Reiczigel J., Török T., Tekes K., Elevated plasma nociceptin level in patients with Wilson disease, *Brain Res. Bull.*, 2002, 58(3): 311-313.
  95. Hawes B.E., Graziano M.P., Lambert D.G., Cellular actions of nociceptin: transduction mechanisms, *Peptides*, 2000, 21(7): 961-967.
  96. Helyes Z., Németh J., Pintér E., Szolesányi J., Inhibition by nociceptin of neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals, *Br. J. Pharmacol.*, 1997, 121: 613-615.
  97. Henderson G. and McKnight A.T., The orphan opioid receptor and its endogenous ligand – nociceptin/orphanin FQ, *Trends. Pharmacol. Sci.*, 1997, 18 (8): 293–300.
  98. Ho M., Corbett A., McKnight A., Characterization of the ORL1 receptor of the adrenergic nerves in the rat anococcygeus muscle, *Br. J. Pharmacol.*, 2000, 13(2): 349-355.
  99. Holt S., Comelli F., Costa B., Fowler Ch., Inhibitors of fatty acid amide hydrolase reduce carrageenan-induced hind paw inflammation in pentobarbital-treated mice: comparison with indomethacin and possible involvement of cannabinoid receptors, *Br. J. Pharmacol.*, 2005, 146(3): 467-476.
  100. Holzer, P., Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide, and other neuropeptides, *Neuroscience*, 1988, 24: 739-768.
  101. Houtani T., Nishi M., Takeshima H., Nukada T., Sugimoto T., Structure and regional distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, 219: 714-719.
  102. Houtani T., Nishi M., Takeshima H., Sato K., Sakuma S., Kakimoto S., Ueyama T., Noda T., Sugimoto T., Distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor protein and receptor in brain and spinal cord: a study using in situ hybridization and X-gal histochemistry in receptor-deficient mice, *J. Comp. Neurol.*, 2000, 424: 489–508.
  103. Ikeda K., Kobayashi K., Kobayashi T., Ichikawa T., Kumanishi T., Kishida H., Yano R., Manabe T., Functional coupling of the



- nociceptin/orphanin FQ receptor with the G-protein-activated K<sup>+</sup> (GIRK) channel, *Brain. Res. Mol. Brain Res.*, 1997, 45(1): 117-126.
104. Ikeda K., Watanabe M., Ichikawa T., Kobayashi T., Yano R., Kumanishi T., Distribution of prepro-nociceptin/orphanin FQ mRNA and its receptor mRNA in developing and adult mouse central nervous systems, *J. Comp. Neurol.*, 1998, 399: 139-151.
  105. Inoue M., Kobayashi M., Kozaki S., Zimmer A., Ueda H., Nociceptin/orphanin FQ-induced nociceptive responses through substance P release from peripheral nerve endings in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1998, 95(18) :10949-1053.
  106. Ito S., Okuda-Ashitaka E., Minami T., Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interaction with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin, *Neurosci. Res.*, 2001, 41: 299-332.
  107. Itoh M., Takasaki I., Andoh T., Nojima H., Tominaga M., Kuraishi Y., Induction by carrageenan inflammation of prepronociceptin mRNA in VR1-immunoreactive neurons in rat dorsal root ganglia, *Neurosci. Res.*, 2001, 40(3): 227-233.
  108. IUPHAR-DB Ligand: Naloxone. Biological Activity. <http://www.iuphar-db.org/PRODDATABASE/LigandDisplayForward?tab=biology&ligandId=1638>.
  109. Jang H.J., Nam J.H., Choi J., Lee K.T., Park H.J., Antiinflammatory effects of chiisanoside and chiisanogenin obtained from the leaves of *Acanthopanax chiisanensis* in the carrageenan and Freund's complete adjuvant-induced rats, *J. Ethnopharmacol.*, 2005, 97: 359-367.
  110. Jenck F., Moreau J.-L., Martin J.R., Kilpatrick G.J., Reinscheid R.K., Monsma F.J. Jr, Nothacker H.-P., Civelli O., Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1997, 94: 14854-14858.
  111. Jenck F., Wichmann J., Dautzenberg F.M., Moreau J.L., Ouagazzal A.M., Martin J.R., Lundstrom K., Cesura A.M., Poli S.M., Roever S., Kolczewski S., Adam G., Kilpatrick G., A synthetic agonist at the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL1: anxiolytic profile in the rat, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2000, 97: 4938-4943.
  112. Jia Y., Wang X., Aponte S.I., Rivelli M.A., Yang R., Rizzo C.A., Corboz M.R., Priestly T., Hey J.A., Nociceptin/orphanin FQ inhibits capsaicin-induced guinea-pig airway contraction through an inward-rectifier potassium channel, *Br. J. Pharmacol.*, 2002, 135(3): 764-770.
  113. Judd A.K., Kaushanskaya A., Tuttle D.J, Sanchez A., Khroyan T., Polgar W., Toll L., N-terminal modifications leading to peptide ORL1 partial agonists and antagonists, *J. Pept. Res.*, 2003, 62(5): 191-198.
  114. Judd A.K., Tuttle D.J, Jones R.W., Sanchez A., Polgar W., Berzetei-Gurske I., Toll L., Structure-activity studies on high affinity NOP-active hexapeptides, *J. Pept. Res.*, 2004, 64(3): 87-94.

115. Kapusta D.R., Neurohumoral effects of orphanin FQ/nociceptin: relevance to cardiovascular and renal function, *Peptides*, 2000, 21: 1081–1099.
116. Kato S., Tsuzuki Y., Hokari R., Okada Y., Miyazaki J., Matsuzaki K., Iwai A., Kawaguchi A., Nagao S., Itoh K., Suzuki H., Nabeshima T., Miura S., Role of nociceptin/orphanin FQ (Noc/oFQ) in murine experimental colitis, *J. Neuroimmunol.*, 2005, 161(1-2): 21-28.
117. Katsuyama S., Mizoguchi H., Komatsu T., Sakurada C., Tsuzuki M., Sakurada S., Sakurada T., Antinociceptive effects of spinally administered nociceptin/orphanin FQ and its N-terminal fragments on capsaicin-induced nociception, *Peptides*, 2011, 32(7): 1530-1535.
118. Kawamoto H., Ozaki S., Itoh Y., Miyaji M., Arai S., Nakashima H., Kato T., Ohta H., Iwasawa Y., Discovery of the first potent and selective small molecule opioid receptor-like (ORL1) antagonist: 1-[(3R,4R)-1-cyclooctylmethyl-3-hydroxymethyl-4-piperidyl]-3-ethyl-1, 3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one (J-113397), *J. Med. Chem.*, 1999, 42(25): 5061-5063.
119. Kawano C., Okada K., Honda T., Nose T., Sakaguchi K., Costa T., Shimohigashi Y., Structural requirements of nociceptin antagonist Ac-RYYRIK-NH<sub>2</sub> for receptor binding, *J. Pept. Sci.*, 2002, 8: 561–569.
120. Keith D.E. Jr., Maung T., Anton B., Evans C.J., Isolation of cDNA clones homologous to opioid receptors, *Regul. Pept.* 1994, 54: 143–144.
121. Kest B., Hopkins E., Palmese C.A., Chen Z.P., Mogil J.S., Pintar J.E., Morphine tolerance and dependence in nociceptin/orphanin FQ transgenic knock-out mice, *Neurosci.*, 2001, 104: 217-222.
122. Khattab M.M., TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: a key role for superoxide anion, *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, 548: 167-173.
123. Kieffer B.L., Befort K., Gaveriaux-Ruff C., Hirth C.G., The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization, *Proc. Natl. Acad. Sc., USA*, 1992, 89: 12048–12052.
124. Kilo S., Harding-Rose C., Hargreaves K.M., Flores C.M., Peripheral CGRP release as a marker for neurogenic inflammation: a model system for the study of neuropeptide secretion in rat paw skin, *Pain*, 1997, 73(2): 201-207.
125. Kimura T., Kitaishi K., Hiramatsu K., Yoshida M., Ito Y., Kume M., Yamaki K., Suzuki R., Takagi K., Intradermal application of nociceptin increases vascular permeability in rats: the possible involvement of histamine release from mast cells, *Eur. J. Pharmacol.*, 2000, 407: 327-332.
126. Knoflach F., Reinscheid R.K., Civelli O., Kemp J.A., Modulation of voltagegated calcium channels by orphanin FQ in freshly dissociated hippocampal neurons, *J. Neurosci.*, 1996, 16: 6657–6664.

127. Kocsis L., Orosz G., Magyar A., Al-Khrasani M., Kató E., Rónai A.Z., Bes B., Meunier J.C., Gündüz O., Tóth G., Borsodi A., Benyhe S., Nociceptin antagonism: probing the receptor by N-acetyl oligopeptides, *Regul. Pept.*, 2004, 122(3): 199-207.
128. Kotlińska J., Rafalski P., Nociceptyna/orfanina FQ (N/OFQ) – opioid, antyopioid czy neuromodulator? (Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) – the opioid, antioioid or neuromodulator?), *Postepy Hig. Med. Dosw.*, (online), 2004, 58: 209-215.
129. Kummer W. and Fischer A., Nociceptin and its receptor in guinea-pig sympathetic ganglia, *Neurosci. Lett.*, 1997, 234: 35–38.
130. La Ranna G., Russo R., D’Agostino G., Raso G.M., Iacono A., Meli R., Oiomelli D., Calingnano A., AM 404, an anandamide transport inhibitor, reduces plasma extravasation in a model of neuropathic pain in rat: role for cannabinoid receptors, *Neuropharmacology*, 2008, 54(3): 521-509.
131. Lachowicz J.E., Shen Y., Monsma F.J., Sibley D.R., Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family, *J. Neurochem.*, 1995, 64: 34–40.
132. Lam F.Y. and Ferrell W.R., Inhibition of carrageenan induced inflammation in the rat knee joint by substance P antagonist, *Ann. Rheum. Dis.*, 1989, 48(11): 928-932.
133. Lambert D.G., The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2008, 7: 694–710.
134. Lee MG., Undem BJ., Brown C., Carr MJ., Effect of nociceptin in acid-evoked cough and airway sensory nerve activation in guinea pigs, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2006, 173(3): 271-5.
135. Leduc C., Gentili M.E., Estebe J.P., Le Corre P., Moulinoux J.P., Ecoffey C., The effect of local anesthetics and amitriptyline on peroxidation in vivo in an inflammatory rat model: preliminary reports, *Anesth. Analg.*, 2002, 95: 992-996.
136. Letchworth S.R., Mathis J.P., Rossi G.C., Bodnar R.J., Pasternak G.W., Autoradiographic localization of (125)I[Tyr(14)]orphanin FQ/nociceptin and (125)I[Tyr(10)]orphanin FQ/nociceptin(1-11) binding sites in rat brain, *J. Comp. Neurol.*, 2000, 423(2): 319-329.
137. Leventhal L., Mathis J.P., Rossi G.C., Pasternak G.W., Bodnar R.J., Orphan opioid receptor antisense probes block orphanin FQ-induced hyperphagia, *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, 349: R1–R3.
138. Liebel J.T., Swandulla D., Zeilhofer H.U., Modulation of excitatory synaptic transmission by nociceptin in superficial dorsal horn neurones of the neonatal rat spinal cord, *Br. J. Pharmacol.*, 1997, 121(3): 425-432.
139. Lotz M., Vaughan J. H., and Carson D. A., Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes, *Science*, 1988, 241: 1218-1221.

140. Lu T.C., Ko Y.Z., Huang H.W., Hung Y.C., Lin Y.C., Peng W.H., Analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Glycyne tomentella* root in mice, *J. Ethnopharmacol.*, 2007, 113: 142-148.
141. Madeddu P., Salis M.B., Milia A.F., Emanuelli C., Guerrini R., Regoli D., Calò G., Cardiovascular effects of nociceptin in unanesthetized mice, *Hypertension*, 1999, 33(3): 914-919.
142. Maggi C.A., The pharmacology of afferent function of sensory nerves, *J. Auton. Pharmacol.*, 1991, 11: 173-208.
143. Mahmud A., Santha P., Paule C.C., Nagy I., Cannabinoid 1 receptor activation inhibits transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-mediated cationic influx into rat cultured primary sensory neurons, *Neuroscience*, 2009, 162(4): 1202-1211.
144. Maione S., Petrocellis L., Novellis V., Moriello A., Petrosino S., Palazzo E., Rossi F., Woodward D., Marzo V., Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors, *Br. J. Pharmacol.*, 2007, 150(6): 766-781.
145. Malinowska B., Godlewski G., Schliker E., Function of nociceptin and opioid OP4 receptors in the regulation of the cardiovascular system, *J. Physiol. Pharmacol.*, 2002, 53: 301-324.
146. Mamiya T., Noda Y., Nishi M., Takeshima H., Nabeshima T., Enhancement of spatial attention in nociceptin/orphanin FQ receptor-knockout mice, *Brain Res.*, 1998, 783(2): 236-240.
147. Marini P., Romanelli L., Valeri D., Cascio M.G., Tucci P., Valeri P., Palmery M., Biphasic regulation of the acute  $\mu$ -withdrawal and CCK-8 contracture responses by the ORL-1 system in guinea pig ileum, *Pharmacol. Res.*, 2012a, 65(1): 100-110.
148. Marini P., Romanelli L., Valeri D., Cascio M.G., Tucci P., Valeri P., Palmery M., The NOP receptor involvement in both withdrawal- and CCK-8-induced contracture responses of guinea pig isolated ileum after acute activation of  $\kappa$ -opioid receptor, *Peptides*, 2012b, 38(2): 418-26.
149. Mathis J.P., Ryan-Moro J., Chang A., Hom J.S.H., Scheindberg D.A., Pasternak G.W., Biochemical evidence for orphanin FQ/nociceptin receptor heterogeneity in mouse brain, *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 1997, 230: 462-465.
150. Matthes H., Seward E.P., Kieffer B., North R.A., Functional selectivity of orphanin FQ for its receptor coexpressed with potassium channel subunits in *Xenopus laevis* oocytes, *Mol. Pharmacol.*, 1996, 50(3): 447-450.
151. Marti M., Stocchi S., Paganini F., Mela F., De Risi C., Calò G., Guerrini R., Barnes T.A., Lambert D.G., Beani L., Bianchi C., Morari M., Pharmacological profiles of presynaptic nociceptin/orphanin FQ receptors modulating 5-hydroxytryptamine and noradrenaline release in the rat neocortex, *Br. J. Pharmacol.*, 2003, 138(1): 91-98.

152. Marti M., Mela F., Fantin M., Zucchini S., Brown J.M., Witta J., Di Benedetto M., Buzas B., Reinscheid R.K., Salvadori S., Guerrini R., Romualdi P., Candeletti S., Simonato M., Cox B.M., Morari M., Blockade of nociceptin/orphanin FQ transmission attenuates symptoms and neurodegeneration associated with Parkinson's disease, *J. Neurosci.*, 2005, 25: 9591–9601.
153. Maslov L.N., Krylatov A.V., Lishmanov I.B., Albrecht E., The anti-arrhythmia properties of the functional opioid agonist orphanin FQ (nociceptin), *Eksp. Klin. Farmakol.*, 1999, 62: 21–24.
154. Mason S.L., Nicholson J.R., Lee K., McKnight A.T., The effect of the agonist Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> and the antagonist [Phe1 $\psi$ (CH<sub>2</sub>-NH)Gly2]nociceptin(1–13)NH<sub>2</sub> at the ORL1 receptor of the central and peripheral sites, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 1998, 24: 1358.
155. Mason S.L., Ho M., Nicholson J., McKnight A.T., In vitro characterization of Ac-RYYRWK-NH(2), Ac-RYYRIK-NH(2) and [Phe1 $\Psi$ (CH(2)-NH)Gly2] nociceptin(1-13)NH(2) at rat native and recombinant ORL(1) receptors, *Neuropeptides*, 2001, 35(5-6): 244-256.
156. McDonald J. and Lambert D.G., Opioids Receptors, *Contin. Educ. Anaesh. Crit. Care Pain*, 2005, 5(1): 22-25.
157. McDonald J., Leonard A.D., Serrano-Gomez A., Young S.P., Swanevelter J., Thompson J.P., Lambert D.G., Assessment of nociceptin/orphanin FQ and mu-opioid receptor mRNA in the human right atrium, *Br. J. Anaesth.*, 2010, 104: 698–704.
158. Meis S. and Pape H.C., Postsynaptic mechanisms underlying responsiveness of amygdaloid neurons to nociceptin/orphanin FQ, *J. Neurosci.* 1998, 18(20): 8133-8144.
159. Meunier J.C., Mollereau C., Toll L., Suandeau C., Maisand C., Alvinerie P., Butour J.L., Guilemot G.C., Ferrara P., Monsarrat B., Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor, *Nature*, 1995, 377: 532-535.
160. Meunier J.C., Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor, *Eur. J. Pharmacol.*, 1997, 340(1): 1-15
161. Miller T.R. and Fulford A.J., Regulation of N/OFQ/orphaninFQ secretion by immune cells and functional modulation of interleukin-2, *Peptides*, 2007, 28: 2243-2252.
162. Minami T., Okuda-Ashitaka E., Nishiuchi Y., Kimura T., Tachibana S., Mori H., Ito S., Anti-nociceptive responses produced by human putative counterpart of nocistatin, *Br. J. Pharmacol.*, 1998, 124: 1016–1018.
163. Mogil J.S., Grisel J.E., Reinscheid R.K., Givelli O., Belknap J.K., Grandy D.K., Orphanin FQ is a functional antiopioid peptide, *Neurosci.*, 1996, 75: 333-337.

164. Mogil J.S. and Pasternak G.W., The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family, *Pharmacol. Rev.*, 2001, 53: 381–415.
165. Mollereau C., Parmentier M., Mailleux P., Butour J.L., Moisand C., Chalon P., Caput D., Vassart G., Meunier J.C., ORL1, a novel member of the opioid receptor family – Cloning, functional expression and localization, *FEBS Lett.*, 1994, 341, 33-38.
166. Mollereau C., Simons M.J., Soularue P., Liners F., Vassart G., Meunier J.C., Parmentier M., Structure, tissue distribution and chromosomal localization of the prepronociceptin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1996, 93: 8666-8670.
167. Mollereau C., Mouledous L., Lapalu S., Cambois G., Moisand C., Butour J.L., Meunier J.C., Distinct mechanisms for activation of the opioid receptor-like 1 and kappa-opioid receptors by nociceptin and dynorphin A, *Mol. Pharmacol.*, 1999, 55(2): 324-331.
168. Mollereau C. and Mouledous L., Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor, *Peptides*, 2000, 21: 907-917.
169. Monteillet-Agius G., Fein J., Anton B., Evans C.J., ORL-1 and mu opioid receptor antisera label different fibers in areas involved in pain processing, *J. Comp. Neurol.*, 1998, 399: 373–383.
170. Montiel J.-L., Cornille F., Roques B., Noble F., Nociceptin/orphanin FQ metabolism: role of aminopeptidase and endopeptidase 24.15. *J. Neurochem.*, 1997, 68: 354-361.
171. Moran T.D., Abdulla F.A., Smith P.A., Cellular neurophysiological actions of nociceptin/orphanin FQ, *Peptides*, 2000, 21(7): 969-976.
172. Morini G., Caro G., Guerrini R., Massi M., Polidori C., N/OFQ/orphanin FQ prevents ethanol-induced gastric lesions in the rat, *Regul. Pept.*, 2005, 124: 203-207.
173. Mouledous L., Topham C.M., Mazarguil H., Meunier J.C., Direct identification of a peptide binding region in the opioid receptor-like 1 receptor by photoaffinity labeling with [Bpa(10), Tyr(14)]nociceptin, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 29268–29274.
174. Murphy N.P., Ly H.T., Maidment N.T., Intracerebroventricular orphanin FQ/nociceptin suppresses dopamine release in the nucleus accumbens of anaesthetized rats, *Neuroscience*, 1996, 75(1): 1-4
175. Murphy N.P. and Maidment N.T., Orphanin FQ/nociceptin modulation of mesolimbic dopamine transmission determined by microdialysis, *J. Neurochem.*, 1999, 73: 179–186.
176. Narayanan S. & Maidment N.T., Orphanin FQ and behavioral sensitization to cocaine, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1999, 63: 271–277.
177. Nardi G.M., Siqueira Junior J.M., Delle Monache F., Pizzolatti M.G., Ckless K., Ribeiro-do-Valle R.M., Antioxidant and anti-inflammatory effects of

- products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats, *Phytomedicine*, 2007, 14: 115-122.
178. Naydenova E.D., Todorov P.T., Pavlov N.D., Dzhambazova E.B., Bocheva A.I., N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> analogues with aminophosphonate moiety: synthesis and analgesic activity, *Proceedings of the 31<sup>st</sup> European Peptide Symposium*, European Peptide Society, 2010.
  179. Neal M.J., Cunningham J.R., Paterson S.J., McKnight A.T., Inhibition by nociceptin of the light-evoked release of ACh from retinal cholinergic neurons, *Br. J. Pharmacol.*, 1997, 120(8): 1399-1400.
  180. Neal C.R., Mansour A., Reinscheid R., Nothacker H.P., Civelli O., Akil H., Watson S.J., Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: comparison of ORL1 receptor mRNA expression with [125I]-[14Tyr]- orphanin FQ binding, *J. Comp. Neurol.*, 1999a, 412: 563-605.
  181. Neal C.R., Mansour A., Reinscheid R., Nothacker H.P., Civelli O., Watson S.J., Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat, *J. Comp. Neurol.*, 1999b, 406: 503-547.
  182. Németh J., Helyes Z., Oroszi G., Thán M., Pintér E., Szolcsányi J., Inhibition of nociceptin on sensory neuropeptide release and mast cell-mediated plasma extravasation in rats, *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, 347: 101-104.
  183. Nicol B., Lambert D.G., Rowbotham D.J., Smart D., McKnight A.T., Nociceptin induced inhibition of K<sup>+</sup> evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices, *Br. J. Pharmacol.*, 1996, 119(6): 1081-1083.
  184. Nishi M., Takeshima H., Mori M., Nakagawara K., Takeuchi T., Structure and chromosomal mapping of genes for the mouse  $\kappa$ -opioid receptor and an opioid receptor homologue (MOR-C), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 205: 1353-1357.
  185. Nicholson J.R., Paterson S.J., McKnight A.T., Characterisation of the response in the rat vas deferens to the ORL-1 agonist nociceptin, *Br. J. Pharmacol.*, 1996, 119:136.
  186. Nicholson J.R., Paterson S.J., Menzies J.R., Corbett A.D., McKnight A.T., Pharmacological studies on the "orphan" opioid receptor in central and peripheral sites, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1998, 76(3): 304-313.
  187. Noble F. and Roques B.P., Association of aminopeptidase N and endopeptidase 24.15 inhibitors potentiate behavioral effects mediated by nociceptin/orphanin FQ in mice, *FEBS Lett.*, 1997, 401(2-3): 227-229.
  188. Norton C.S., Neal C.R., Kumar S., Akil H., Watson S.J., Nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor-like receptor mRNA expression in dopamine systems, *J. Comp. Neurol.*, 2002, 444(4): 358-368.
  189. Nothacker H.P., Reinscheid R.K., Mansour A., Henningsen R.A., Ardati A., Monsma Jr., Watson S.J., Civelli O., Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1996, 93: 8677-8682.

190. O'Donnell A.M., Ellies L.M., Riedl M.S., Elde R.P., Mawe G.M., Distribution and chemical coding of orphanin FQ/nociceptin- immunoreactive neurons in the myenteric plexus of guinea pig intestines and sphincter of Oddi, *J. Comp. Neurol.*, 2001, 430: 1-11.
191. Okada K., Sujaku T., Chuman Y., Nakashima R., Nose T., Costa T., Yamada Y., Yokoyama M., Nagahisa A., Shimohigashi Y., Highly potent nociceptin analog containing the Arg-Lys triple repeat, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 278(2): 493-498.
192. Okuda-Ashitaka E., Tashibana S., Houtani T., Minami T., Masu Y., Nishi M., Takeshima H., Sugimoto T., Ito S., Identification and characterization of the endogenous ligand for opioid receptor homologue ROR-C: its involvement in allodynic response to innocuous stimulus, *Mol. Brain Res.*, 1996, 43: 96-104.
193. Okuda-Ashitaka E., Minami T., Tachibana S., Yoshihara Y., Nishiuchi Y., Kimura T., Ito S., Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission, *Nature (Lond)* 1998, 392: 286-289.
194. Osinski M.A., Pampusch M.S., Murtaugh M.P., Brown D.R., Cloning, expression and functional role of a nociceptin/orphanin FQ receptor in the porcine gastrointestinal tract, *Eur. J. Pharmacol.*, 1999, 365: 281-289.
195. Osinski M.A. and Brown D.R., Orphanin FQ/nociceptin: a novel neuromodulator of gastrointestinal function, *Peptides*, 2000, 21: 999-1006.
196. Oyanagui Y., Inflammation and superoxide production by macrophages, *Agents Action Suppl.*, 1980, 7: 174-179.
197. Ozaki S., Kawamoto H., Itoh Y., Miyaji M., Iwasawa Y., Ohta H., A potent and highly selective nonpeptidyl nociceptin/orphanin FQ receptor (ORL1) antagonist: J-113397, *Eur. J. Pharmacol.*, 2000, 387: R17-R18.
198. Pan Y.-X., Cheng J., Xu J., Pasternak G.W., Cloning, expression and classification of a kappa3-related opioid receptor using antisense oligodeoxynucleotides, *Regul. Pept.*, 1994, 54: 217-218.
199. Pan Y.-X., Cheng J., Xu J., Rossi G., Jacobson E., Ryan-Moro J, Brooks A.I., Dean G.E., Standifer K.M., Pasternak G.W., Cloning and functional characterization through antisense mapping of a  $\kappa_3$ -related opioid receptor, *Mol. Pharmacol.*, 1995, 47: 1180-1188.
200. Parola M., Curzio M., Negro F., Paradisi L., Torrielli M.V., Lipid peroxidation in the rat liver after acute inflammation induced by carrageenan. I. Influence of non-steroidal anti-inflammatory agents, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1981, 57: 638-644, (in Italian).
201. Patel H.J., Giembycz M.A., Spicuzza L., Barnes P.J., Belvisi M.J., Naloxone-insensitive inhibition of acetylcholine release from parasympathetic nerves innervating guinea-pig trachea by the novel opioid, nociceptin, *Br. J. Pharmacol.*, 1997, 12(5): 735-736.



202. Peiser C., Udem B.J., Fischer A., Nociceptin effects in the airways, *Peptides*, 2000, 21: 995–998.
203. Peluso J., LaForge K.S., Matthes H.W., Kreek M.J., Kieffer B.L., Gavériaux-Ruff C., Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells, *J. Neuroimmunol.*, 1998, 81: 184–192.
204. Peluso J., Gavériaux-Ruff C., Matthes H.W., Filliol D., Kieffer B.L., Orphanin FQ/nociceptin binds to functionally coupled ORL1 receptors on human immune cell lines and alters peripheral blood mononuclear cell proliferation, *Brain. Res. Bull.*, 2001, 54(6): 655–660.
205. Polidori C., Calo' G., Ciccocioppo R., Guerrini R., Regoli D., Massi M., Pharmacological characterization of the nociceptin receptor mediating hyperphagia: identification of a selective antagonist, *Psychopharmacology*, 2000, 148: 430–437.
206. Polidori C., Massi M., Guerrini R., Grandi D., Lupo D., Morini G., Peripheral mechanisms involved in gastric mucosal protection by intracerebroventricular and intraperitoneal N/OFQ in rats, *Endocrinology*, 2005, 146: 3861–3867.
207. Pomonis J.D., Billington C.J., Levine A.S., Orphanin FQ, agonist of orphan opioid receptor ORL1, stimulates feeding in rats, *Neuroreport*, 1996, 8: 369–371.
208. Pourpak Z., Ahmadiani A., Alebouyeh M., Involvement of interleukin-1 $\beta$  in systemic morphine effects on paw oedema in a mouse model of acute inflammation, *Scand. J. Immunol.*, 2004, 59: 273–277.
209. Rawls S.M., Schroeder J.A., Ding Z., Rodrigues T., Zaveri N., NOP receptor antagonist, JTC-801, blocks cannabinoid-evoked hypothermia in rats, *Neuropeptides*, 2007, 41(4): 239–247.
210. Reinscheid R.K., Nothacker H.P., Bourson A., Ardati A., Henningsen R.A., Bunzow J.R., Grandy D.K., Langer H., Monsma F.J., Civelli O., Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor, *Science*, 1995, 270: 792–794.
211. Reinscheid R.K., Ardati A., Monsma F.J. Jr., Civelli O., Structure-activity relationship studies on the novel neuropeptid orphanin FQ, *J. Med. Chem.*, 1996, 271: 14163–14168.
212. Reinscheid R., Higelin J., Henningsen R., Monsma F.J., Civelli O., Structures and that delineate orphanin FQ and dinorphin A pharmacological selectivities, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 1490–1495.
213. Richardson J.D. and Vasko M.R., Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2002, 302(3): 839–845.

214. Riedl M., Shuster S., Vulchanova L., Wang J., Loh H.H., Elde R., Orphanin FQ/nociceptin-immunoreactive nerve fibers parallel those containing endogenous opioids in rat spinal cord, *Neuroreport*, 1996, 7(8): 1369-1372.
215. Rizzi A., Bigoni R., Calò G., Guerrini R., Salvadori S., Regoli D., [Nphe<sup>1</sup>]nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub> antagonizes nociceptin effects in the mouse colon, *Eur. J. Pharmacol.*, 1999, 285: R3-R5.
216. Rizzi A., Bigoni R., Marzola G., Guerrini R., Salvadori S., Regoli D., Calò G., The nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> potentiates morphine analgesia, *Neurorep.*, 2000, 11: 2369-2372.
217. Rizzi D., Bigoni R., Rizzi A., Jenck F., Wichmann J., Guerrini R., Regoli D., Calò G., Effects of Ro 64-6198 in nociceptin/orphanin FQ-sensitive isolated tissues, *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 2001, 363(5): 551-555.
218. Rizzi D., Rizzi A., Bigoni R., Camarda V., Marzola G., Guerrini R., De Risi C., Regoli D., Calò G., [Arg(14),Lys(15)]nociceptin, a highly potent agonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor: in vitro and in vivo studies, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2002, 300(1): 57-63.
219. Rominger A., Förster S., Zentner J., Dooley D.J., McKnight A.T., Feuerstein T.J., Jackisch R., Vlaskovska M., Comparison of the ORL1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in human and rat neocortical slices, *Br. J. Pharmacol.*, 2002, 135(3): 800-806.
220. Rosenberger J., Petrovics G., Buzas B., Oxidative stress induces proorphanin FQ and proenkephalin gene expression in astrocytes through p38- and ERK-MAP kinases and NF-kappaB, *J. Neurochem.*, 2001, 79: 35-44.
221. Rossi G.C., Leventhal L., Bolan E.A., Pasternak G.W., Pharmacological characterization of orphanin FQ/nociceptin and its fragments, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997, 282(2): 858-865.
222. Rothman R.B., A review of the role of anti-opioid peptides in morphine tolerance and dependence, *Synapse*, 1992, 12: 129-138.
223. Safavi A. and Hersh L.B., Degradation of dynorphin-related peptides by the puromycin-sensitive aminopeptidase and aminopeptidase M., *J. Neurochem.*, 1995, 65(1): 389-395.
224. Sagar D.R., Smith P.A., Millns P.J., Smart D., Kendall D.A., Chapman V., TRPV1 and CB(1) receptor-mediated effects of the endovanilloid/endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine on primary afferent fibre and spinal cord neuronal responses in the rat, *Eur. J. Neurosci.*, 2004, 20(1): 175-184.
225. Salis M.B., Emanuelli C., Milia A.F., Guerrini R., and Madeddu P., Studies of the cardiovascular effects of nociceptin and related peptides, *Peptides*, 2000, 21: 985-994.

226. Salvadori S., Picone D., Tancredi T., Guerrini R., Spadaccini R., Lazarus L., Regoli D., Temussi P., Solution conformation of nociceptin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 233: 640-643.
227. Salvadori S., Guerrini R., Calò G., Regoli D., Structure-activity studies on nociceptin/orphanin FQ: from full agonist, to partial agonist, to pure antagonist, *Farmaco*, 1999, 54(11-12): 810-25.
228. Salvemini D., Mazzon E., Dugo L., Riley D.P., Serraino I., Caputi A.P., Pharmacological manipulation of the inflammatory cascade by the superoxide dismutase mimetic, M40403, *Br. J. Pharmacol.*, 2001, 132: 815-827.
229. Sandin J., Georgieva J., Schott P.A., Ogren S.O., Terenius L., Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats, *Eur. J. Neurosci.*, 1997, 9: 194–197.
230. Sandin J., Georgieva J., Silberring J., Terenius L., In vivo metabolism of nociceptin/orphanin FQ in rat hippocampus, *Neuroreport*, 1999, 10: 71–76.
231. Serhan C.N., Fierro I.M., Chiang N., Pouliot M., Cutting edge: nociceptin stimulates neutrophil chemotaxis and recruitment: inhibition by aspirin-triggered-15-epi-lipoxin A4, *J. Immunol.*, 2001, 166(6): 3650-3654.
232. Schlicker E. and Morari M., Nociceptin/orphanin FQ and neurotransmitter release in the central nervous system. *Peptides*, 2000, 21(7): 1023-1029.
233. Schulz S., Schreff M., Nuss D., Gramsch C., Holtt V., Nociceptin/orphanin FQ and opioide peptides show overlapping distribution but not co-localization in pain-modulatory brain regions, *Neuro Rep.*, 1996, 7: 3021-3025.
234. Schweizer F., Glycosamino acids: Building blocks for combinatorial synthesis – implications for drug discovery, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 2002, 41: 230-253.
235. Scoto G.M., Aricò G., Ronsisvalle S., Parenti C., Effects of intraplantar nocistatin and (±)-J 113397 injections on nociceptive behavior in a rat model of inflammation, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2012, 100(3): 639-644.
236. Shimohigashi Y., Hatano R, Fujita T., Nakashima R., Nose T., Sujaku T., Saigo A., Shinjo K., Nagahisa A., Sensitivity of opioid receptor-like receptor ORL1 for chemical modification on nociceptin, a naturally occurring nociceptive peptide, *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 39(27): 23642–23645.
237. Simon R.J., Kania R.S., Zuckermann R.N., Huebner V.D., Jewell D.A., Banville S., Ng S., Wang L., Rosenberg S., Marlowe C.K., Spellmeyer D.C., Tan R., Frankel A.D., Santi D.V., Cohen F.E., Barlett P.A., Peptoids: a modular approach to drug discovery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1992, 89(20): 9367-9371.
238. Sinchak K., Hendricks D.G., Baroudi R., Micevych P.E., Orphanin FQ/nociceptin in the ventromedial nucleus facilitates lordosis in female rats, *Neuroreport*, 1997, 8: 3857–3860.

239. Smith S., Terminelli C., Denhardt G., Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice, *Pharmacol. Exp. Therap.*, 2000, 239(1): 136-150.
240. Smoluch M.T., Suder P., Kotlinska J., Salberg M., Siberring J., Enzymatic degradation of nociceptin studied by LC-MS, *Protein Pept. Lett.*, 1999, 6: 49-53.
241. Spadaro A., Ajello A., Luigiano C., Morace C., Resta M.L., Berlinghieri G., Campo S., Scisca C., Alibrandi A., D'Arrigo G., Alessi N., Ferrau O., Freni M.A., Low utility of plasma Nociceptin/orphanin FQ in the diagnosis of hepatocellular carcinoma, *World J. Gastroenterol.*, 2006, 12(29): 4716-4720.
242. Stratford T.R., Holahan M.R., Kelley A.E., Injections of nociceptin into nucleus accumbens shell or ventromedial hypothalamic nucleus increase food intake, *Neuroreport*, 1997, 8(2): 423-426.
243. Suder P., Kotinska J., Smoluch M.T., Sallberg M., Silberring J., Metabolic fate of nociceptin/orphanin FQ in the rat spinal cord and biological activity of its released fragment, *Peptides*, 1999, 20: 239-247.
244. Sugimoto Y., Shimizu A., Kato T., Satoh A., Ozaki S., Ohta H., Okamoto O., Design, synthesis, and biological evaluation of indole derivatives as novel nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) receptor antagonists, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 2006, 16(13): 3569-3573.
245. Sun Y.Y., Luo C., Li Z., Chen J., Differential actions of intrathecal nociceptin on peripheral spontaneous nociception, hyperalgesia and inflammation produced by subcutaneous bee venom injection in conscious rats, *Sheng Li Xue Bao*, 2004, 56: 321-327.
246. Taniguchi H., Yomota E., Nogi K., Onoda Y., Ikezawa K., The effect of nociceptin, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, on rat colonic contraction and transit, *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, 353(2-3): 265-271.
247. Tekes K., Hantos M., Bizderi B., Gyenge M., Kecskemeti V., Huszti Z., Nociceptin-induced histamine release in the brain: comparison with compound 48/80- and substance P-induced amine secretions, *Inflamm. Res.*, 2006, 1: 30-31.
248. Terenius L., Sandin J., Sakurada T., Nociceptin/orphanin FQ metabolism and bioactive metabolites, *Peptides*, 2000, 21: 919-922.
249. Thomsen C., Valsborg J.S., Platou J., Martin J., Foged C., Johansen N.L., Olsen U.B., Madsen K., [<sup>3</sup>H]ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub>, a novel specific radioligand for the nociceptin/ orphanin FQ receptor, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 2000, 362: 538-545.
250. Topham C.M., Mouldous L., Poda G., Maigret B., Meunier J.C., Molecular modelling of the ORL1 receptor and its complex with nociceptin, *Protein Eng.*, 1998, 11: 1163-1179.

251. Trombella S., Vergura R., Falzarano S., Guerrini R., Calo G., Spisani S., Nociceptin/orphanin FQ stimulates human monocyte chemotaxis via NOP receptor activation, *Peptides*, 2005, 26(8): 1497-1502.
252. Ueda H., Yamaguchi T., Tokuyama S., Inoue M., Nishi M. and Takeshima H., Partial loss of tolerance liability to morphine analgesia in mice lacking the nociceptin receptor gene, *Neurosci. Lett.*, 1997, 237: 136-138.
253. Ueda H., Inoue M., Takeshima H., Iwasawa Y., Enhanced spinal nociception receptor expression develops morphine tolerance and dependence, *J. Neurosci.*, 2000, 20: 7640-7647.
254. Van Rossum, J.M. and F.G. van den Brink. Cumulative dose-response curves. I. Introduction to the technique. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 143, 1963, 1-2: 240-246.
255. Van Rossum, J.M. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1963, 143: 620-624.
256. Varani K., Calo G., Rizzi A., Meright S., Toth G., Guerrini R., Salvadori S., Borea P., Reguli D., Nociceptin receptor binding in mouse forebrain membranes: thermodynamic characteristics and structure-activity relationship, *Br. J. Pharmacol.*, 1998, 125: 1485-1490.
257. Varani K., Rizzi A., Calo G., Bigoni R., Toth G., Guerrini R., Gessi S., Salvadori S., Borea P., Reguli D., Pharmacology of [Tyr1]nociceptin analogs: receptor binding and bioassay studies, *Naun. Schmied. Arch. Pharmacol.*, 1999, 360: 270-277.
258. Vaughan C.W. and Christie M.J., Increase by the ORL(1) receptor (opioid receptor-like 1) ligand, nociceptin, of inwardly rectifying K conductance in dorsal raphe nucleus neurones, *Br. J. Pharmacol.*, 1996, 117: 1609-1611.
259. Vaughan C.W., Ingram S.L., Christie M.J., Actions of the ORL1 receptor ligand nociceptin on membrane properties of rat periaqueductal gray neurons in vitro, *J. Neurosci.*, 1997, 17: 996-1003.
260. Vlaskovska M., Kazakov L., Suder P., Silberring J., Terenius L., Biotransformation of nociceptin/orphanin FQ by enzyme activity from morphine-naive and morphine treated cell cultures, *Brain Res.*, 1999, 818: 212-220.
261. Vlaskovska M. and Kasakov L., Nociceptin/Orphanin FQ: The novel peptide with multiple old regulatory functions, *Biomed. Rev.*, 2000, 11: 1-17.
262. Wakade A.R. S.M. Kirpekar. Chemical and histochemical studies on the sympathetic innervation of the vas deferens and seminal vesicle of the guinea pig. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187, 1971: 432-441.
263. Wick M.J., Minnerath S.R., Roy S., Ramakrishnan S., Loh H.H., Expression of alternate forms of brain opioid 'orphan' receptor mRNA in activated human peripheral blood lymphocytes and lymphocytic cell lines., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1995, 32(2): 342-347.

264. Wang J.B., Johnson P.S., Imai Y., Persico A.M., Ozenberger B.A., Eppler C.M., Uhl G.R., cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant, *FEBS Lett.*, 1994, 348: 75-79.
265. Wang J.L., Zhu C.B., Cao X.D., Wu G.C., Distinct effect of intracerebroventricular and intrathecal injections of nociceptin/orphanin FQ in the rat formalin test, *Regul. Pept.*, 1999, 79(2-3): 159-63..
266. Williams J.P., McDonald J., Thompson J.P., Rowbotham D.J., Lambert D.G., Human peripheral blood mononuclear cells express themRNA encoding for the nociceptin peptide and its receptor, *Br. J. Anaesth.*, 2006, 96: 260P.
267. Williams JP, Thompson JP, McDonald J, Barnes T.A., Cote T., Rowbotham D.J., Lambert, Human peripheral blood mononuclear cells express nociceptin/orphanin FQ but not m, d or k opioid receptors, *Anesth. Analg.*, 2007, 105(4): 998-1005.
268. Williams J.P., Thompson J.P., Young S.P., Gold S.J., McDonald J., Rowbotham D.J., Lambert D.G., Nociceptin and urotensin-II concentrations in critically ill patients with sepsis, *Br. J. Anaesth.*, 2008, 100(6): 810-814.
269. Winter C.A., Risley E.A., Nuss G.W., Carrageenin induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, 111: 544-547.
270. Wu W.-L., Caplen M.A., Domalski M.S., Zhang H., Fawzi A., Burnett D.A., Synthesis and structure–activity relationships of aminoalkylazetidines as ORL1 receptor ligands, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 2002, 12(21): 3157-3160.
271. Wu Y., Zhou C., Li X., Song L., Wu X., Lin W., Chen H., Bai H., Zhao J., Zhang R., Sun H., Zhao Y., Evaluation of antiinflammatory activity of the total flavonoids of *Laggetera pterodonta* on acute and chronic inflammation models, *Phytother. Res.*, 2006, 20: 585-590.
272. Xu X.J., Hao J.X., Wiesenfeld-Hallin Z., Nociceptin or antinociceptin: potent spinal antinociceptive effect of orphanin FQ/nociceptin in the rat, *Neuro Rep.*, 1996, 7: 2092-2094.
273. Yakimova KS and Pierau F.K., Nociceptin/orphanin FQ: effects on thermoregulation in rats, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1999, 21: 345–352.
274. Yamamoto T., Nozaki-Taguchi N., Sakashita Y., Kimura S., Nociceptin/orphanin FQ: role in nociceptive information processing, *Prog. Neurobiol.*, 1999, 57(5): 527-35.
275. Yasuda K., Raynor K., Kong H., Breder C.D., Takeda J., Reisine T., Bell G.I., Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 1993, 90: 6736-6740.
276. Yu J., Chait B.T., Toll L., Kreek M.J., Nociceptin in vitro biotransformation in human blood, *Peptides*, 1996, 17: 873-876.

277. Yu T.P., Fein J., Phan T., Evans C.J., Xie C.W., Orphanin FQ inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat hippocampus, *Hippocampus*, 1997, 7(1): 88-94.
278. Zaveri N., Peptide and nonpeptide ligands for the nociceptin/orphanin FQ receptor ORL1: research tools and potential therapeutic agents, *Life Sci.*, 2003, 73: 663-678.
279. Zeilhofer H.U. and Calò G., Nociceptin/Orphanin FQ and Its Receptor—Potential Targets for Pain Therapy?, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003, 306(2): 423-429.
280. Ziecher L.M. and Jaim-Etcheverry G., Regional variations in the distribution of noradrenaline along the rat vas deferens, *J. Pharm. Pharmacol.* 1971, 23: 61-63.
281. Zhang G., Murray T.F., Grandy D.K., Orphanin FQ has an inhibitory effect on the guinea pig ileum and the mouse vas deferens, *Brain Res.*, 1997, 772(1-2): 102-106.
282. Zhang C. and McDougall J.J., Stimulation of sensory neuropeptide release by nociceptin/orphanin FQ leads to hyperaemia in acutely inflamed rat knees, *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 148: 938-946.
283. Zheng F., Grandy D.K., Johnson S.W., Actions of orphanin FQ/nociceptin on rat ventral tegmental area neurons in vitro, *Br. J. Pharmacol.*, 2002, 136(7): 1065-1071.