



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

mgr farm. Anna Furgała-Wojas

Wybrane terapie eksperymentalne w zapobieganiu i zwalczaniu bólu neuropatycznego wywołanego oksaliplatyną

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Farmakodynamiki

Wydziału Farmaceutycznego

Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Promotor: Prof. dr hab. Kinga Sałat

Kraków, 2022

*Składam najserdeczniejsze podziękowania mojej Promotor,
Pani prof. dr hab. Kindze Sałat.*

*Dziękuję za podjęcie się opieki naukowej nade mną oraz szansę realizacji tej pracy
doktorskiej, za nieustanne wsparcie, wszystkie rady i wskazówki, wnikliwą redakcję rozprawy,
a przede wszystkim za ogromną życzliwość i poświęcony czas.*

Dziękuję Pani prof. dr hab. Barbarze Filipek oraz Panu prof. dr hab. Jackowi Sapie, kierownikom Katedry Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego za umożliwienie realizacji niniejszej pracy.

Dziękuję wszystkim pracownikom Katedry Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego za cudowną atmosferę i życzliwość, która spotkała mnie na każdym kroku realizacji niniejszych badań.

Szczególne podziękowania kieruję do Pani Teresy Dobrut i Pani Agnieszki Niedbał za pomoc w wykonywaniu badań oraz do Pani Krystyny Sermak za pomoc w sprawach administracyjnych oraz wsparcie, niekończący się entuzjazm i bezcenne rady.

*Całej mojej rodzinie,
przede wszystkim mojemu mężowi Wojciechowi i córce Antosi
– dzięki Waszej miłości czerpię siłę i radość na każdy dzień.*

*Moim przyjaciołom
– bez Was wszystkich nie byłabym tu, gdzie jestem.
Dziękuję za to, że zawsze jesteście przy mnie
– w dobrych i złych chwilach i wspieracie mnie każdego dnia.*



Niniejsze badania finansowano z grantu Narodowego Centrum Nauki pt.: „Opracowanie metody optymalizacji dawkowania leków przeciwbólowych stosowanych jako terapia skojarzona bólu neuropatycznego z wykorzystaniem metod sztucznej inteligencji” (numer: UMO-2015/17/B/NZ7/02937, kierownik projektu: prof. dr hab. Kinga Sałat)

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	10
SPIS TABEL.....	13
SPIS RYCIŃ.....	14
1 WSTĘP	17
1.1 BÓL NEUROPATYCZNY	17
1.2 NEUROPATIA OBWODOWA INDUKOWANA CHEMIOTERAPIĄ	18
1.3 MECHANIZMY USZKODZENIA WYWOŁUJĄCE CIPN	20
1.3.1 <i>Stres oksydacyjny</i>	20
1.3.2 <i>Zaburzona homeostaza wapnia</i>	21
1.3.3 <i>Degeneracja neuronów</i>	22
1.3.4 <i>Zaburzenia w pobudliwości neuronalnej</i>	23
1.3.5 <i>Aktywacja układu odpornościowego i zapalenia w obrębie układu nerwowego</i> ..	25
1.3.6 <i>Neuroprzekazniki w OUN</i>	29
1.4 LECZENIE BÓLU NEUROPATYCZNEGO	32
1.4.1 <i>Rekomendacje leczenia bólu neuropatycznego wg [152]</i>	33
1.5 POSZUKIWANIE NOWYCH ZWIĄZKÓW W LECZENIU I PROFILAKTYCE BÓLU NEUROPATYCZNEGO	37
2 HIPOTEZA I CELE BADAWCZE	41
2.1 CELE PRACY.....	41
3 MATERIAŁY I METODY BADAWCZE	43
3.1 ZWIERZĘTA WYKORZYSTANE W DOŚWIADCZENIACH	43
3.2 BADANE ZWIĄZKI	43
3.3 BADANIA BEHAWIORALNE	45
3.3.1 <i>Schematy badawcze</i>	45
3.4 WYKONANE TESTY BEHAWIORALNE.....	52
3.4.1 <i>Testy behawioralne oceniające rozwój neuropatii obwodowej</i>	52
3.4.2 <i>Testy behawioralne oceniające wpływ badanych związków na funkcje motoryczne</i>	53
3.4.3 <i>Metodyka pomiarów wykonanych w teście preferencji miejsca</i>	53
3.5 ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW	54
4 WYNIKI	55
4.1 MODEL TOKSYCZNEJ NEUROPATII INDUKOWANEJ OKSALIPLATYNĄ – SELEKCJA TEMPERATUR DO BADAŃ WPŁYWU ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY	55
4.2 ANALIZA SKUTECZNOŚCI WYBRANYCH LEKÓW I ZWIĄZKÓW W MODELU NEUROPATII OBWODOWEJ INDUKOWANEJ OKSALIPLATYNĄ.....	57
4.2.1 <i>Badanie oceniające skuteczność duloksetyny</i>	57
4.2.2 <i>Badanie oceniające skuteczność pregabaliny</i>	66
4.2.3 <i>Badanie oceniające skuteczność amitryptyliny</i>	67

4.2.4	<i>Badanie oceniające skuteczność lakozamidu</i>	68
4.2.5	<i>Badanie oceniające skuteczność cebranopadolu i morfiny</i>	71
4.2.6	<i>Badanie oceniające skuteczność ambroksolu</i>	73
4.2.7	<i>Badanie oceniające skuteczność bromheksyny</i>	84
4.2.8	<i>Badanie oceniające skuteczność aripiprazolu</i>	94
4.2.9	<i>Badanie oceniające skuteczność ceftriaksonu</i>	97
4.2.10	<i>Badanie oceniające skuteczność befiradolu (NLX-112)</i>	100
4.2.11	<i>Badanie oceniające skuteczność simwastatyny</i>	102
4.2.12	<i>Badanie oceniające skuteczność minocykliny</i>	104
4.3	ANALIZA SKUTECZNOŚCI ANALGETYCZNEJ WYBRANYCH POŁĄCZEŃ LEKÓW W MODELU NEUROPATII OBWODOWEJ INDUKOWANEJ OKSALIPLATYNĄ	107
4.3.1	<i>Ocena skuteczności przeciwbólowej duloksetyny w połączeniu z ambroksolem</i>	107
4.3.2	<i>Ocena skuteczności przeciwbólowej pregabaliny w połączeniu z ambroksolem</i>	113
4.3.3	<i>Ocena skuteczności przeciwbólowej ambroksolu w połączeniu z amitryptyliną</i>	118
4.3.4	<i>Ocena skuteczności przeciwbólowej lakozamidu w połączeniu z ambroksolem</i>	119
4.3.5	<i>Ocena skuteczności przeciwbólowej pregabaliny w połączeniu z lakozamidem</i>	123
4.3.6	<i>Ocena skuteczności przeciwbólowej aripiprazolu w połączeniu z ceftriaksonem podawanych jednorazowo i wielokrotnie</i>	126
4.3.7	<i>Ocena skuteczności przeciwbólowej simwastatyny w połączeniu z cebranopadolem</i>	129
4.3.8	<i>Ocena skuteczności przeciwbólowej minocykliny w połączeniu z ambroksolem i duloksetyną</i>	132
4.4	ANALIZA WYBRANYCH POMIARÓW AKTYWNOŚCI LOKOMOTORYCZNEJ I WPŁYWU NA KOORDYNACJĘ RUCHOWĄ ZWIERZĄT	145
4.4.1	<i>Wpływ pregabaliny i ambroksolu podawanych oddzielnie i w skojarzeniu na aktywność lokomotoryczną</i>	146
4.4.2	<i>Wpływ ambroksolu i bromheksyny podanych jednorazowo i wielokrotnie na koordynację ruchową</i>	147
4.4.3	<i>Wpływ aripiprazolu i ceftriaksonu podawanych oddzielnie i w skojarzeniu na aktywność lokomotoryczną</i>	148
4.4.4	<i>Wpływ aripiprazolu i ceftriaksonu podawanych oddzielnie i w skojarzeniu na koordynację ruchową</i>	150
4.4.5	<i>Wpływ minocykliny, duloksetyny i skojarzonego podania minocykliny z ambroksolem i duloksetyną na koordynację ruchową zwierząt</i>	151
4.4.6	<i>Wpływ lakozamidu i jego skojarzonego podania z ambroksolem i pregabaliną na koordynację ruchową zwierząt</i>	153
4.5	WPŁYW PREGABALINY I DULOKSETYNY NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY INDUKOWANY BODZCEM TERMICZNYM – TEST PREFERENCJI MIEJSCA	154

5	DYSKUSJA	159
5.1	MODEL CIPN INDUKOWANY POJEDYNCZYM PODANIEM OKSALIPLATYNY	159
5.2	AKTYWNOŚĆ PRZECIWBÓLOWA WYBRANYCH OPIOIDÓW W MODELU CIPN WYWOŁANEJ OKSALIPLATYNĄ	159
5.3	AKTYWNOŚĆ PRZECIWBÓLOWA SIMWASTATYNY W MODELU CIPN WYWOŁANEJ OKSALIPLATYNĄ	160
5.4	AKTYWNOŚĆ PRZECIWBÓLOWA BEFIRADOLU W MODELU CIPN WYWOŁANEJ OKSALIPLATYNĄ	161
5.5	AKTYWNOŚĆ PRZECIWBÓLOWA AMBROKSOLU I BROMHEKSYNY	162
5.6	OCENA SKUTECZNOŚCI PRZECIWBÓLOWEJ WYBRANYCH POŁĄCZEŃ LEKÓW W MODELU CIPN WYWOŁANEJ OKSALIPLATYNĄ.....	163
	5.6.1 <i>Aktywność przeciwbólowa duloksetyny oraz skojarzonego podania duloksetyny z ambroksolem</i>	163
	5.6.2 <i>Aktywność przeciwbólowa skojarzonego podania pregabaliny z ambroksolem</i>	164
	5.6.3 <i>Aktywność przeciwbólowa amitryptyliny i skojarzonego podania amitryptyliny z ambroksolem</i>	166
	5.6.4 <i>Aktywność przeciwbólowa lakozamidu oraz skojarzonego podania lakozamidu z ambroksolem i pregabaliną.....</i>	166
	5.6.5 <i>Aktywność przeciwbólowa aripirazolu i ceftriaksonu oraz skojarzonego podania aripirazolu z ceftriaksonem.....</i>	167
	5.6.6 <i>Aktywność przeciwbólowa minocykliny oraz skojarzonego podania minocykliny z duloksetyną i ambroksolem.....</i>	169
5.7	ZAPOBIEGANIE ROZWOJU CIPN– SCHEMAT PODANIA PROFILAKTYCZNEGO.....	171
	5.7.1 <i>Profilaktyczne podanie duloksetyny.....</i>	171
	5.7.2 <i>Profilaktyczne podanie ambroksolu i bromheksyny</i>	172
5.8	PORÓWNANIE SKUTECZNOŚCI DULOKSETYNY I PREGABALINY W TEŚCIE PREFERENCJI MIEJSCA	174
5.9	OGRANICZENIA PRZEPROWADZONYCH BADAŃ	176
6	WNIOSKI.....	178
7	SPIS PUBLIKACJI OBJĘTYCH ROZPRAWĄ DOKTORSKĄ	180
8	STRESZCZENIE	181
9	ABSTRACT	183
10	BIBLIOGRAFIA	185
11	WYKAZ PUBLIKACJI DOKTORANTA:	208

WYKAZ SKRÓTÓW

5-HT	serotonina
AMPA rec.	receptor aktywowany przez kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy; jeden z czterech głównych receptorów kwasu glutaminowego
ASCO	ang. <i>American Society of Clinical Oncology</i> , Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej
CB ₁ rec.	receptor kanabinoidowy typu 1
CDT	ang. <i>Combination drug therapy</i> , terapia skojarzona leków
CGRP	ang. <i>calcitonin gene-related peptide</i> , peptyd związany z genem kalcytoniny
CIPN	ang. <i>chemotherapy-induced peripheral neuropathy</i> , neuropatia obwodowa indukowana chemioterapią
CRMP-2	ang. <i>collapsin response mediator protein 2</i> , białko mediatora odpowiedzi na kolapsynę 2
CuZnSOD	cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa
CX3CL1	fraktalkina
DA	dopamina
DBH	β -hydroksylaza dopaminy
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy,
DRG	ang. <i>dorsal root ganglion</i> , zwoje korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych
ERK1/2	ang. <i>extracellular signal-regulated kinases</i> , kinaza białkowa regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym
FDA	ang. <i>Food and Drug Administration</i> , Agencja ds. Żywności i leków
GABA	kwas γ -aminomasłowy
GLT-1	ang. <i>glutamate transporter-1</i> , transporter dla glutaminianu typu 1
GM1	kwas gangliozydowo-monosialowy
HIV	ludzki wirus niedoboru/upośledzenia odporności,
IASP	ang. <i>International Association for the Study of Pain</i> , Międzynarodowe Towarzystwo Badań nad Bólem
IL	interleukina
INF- γ	interferon γ
LPS	lipopolisacharyd
MAPK	ang. <i>mitogen-activated protein kinases</i> , kinaza białkowa aktywowana mitogenem
MCP-1, CCL2	ang. <i>monocyte chemoattractant protein 1</i> , białko chemoatraktantu monocytów 1
MIP-1 α , CCL3	białko zapalne makrofagów-1 α
MIP-1 β , CCL4	białko zapalne makrofagów-1 β
MnSOD	ang. <i>manganese superoxide dismutase</i> , mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa
mRNA	ang. <i>messenger RNA</i> , informacyjny kwas rybonukleinowy, matrycowy RNA

mTOR	ang. <i>mammalian target of rapamycin kinase</i> , ssaczy cel rapamycyny, kinaza białkowa treoninowo-serynowa
NA	noradrenalina
NF- κ B	ang. <i>nuclear factor kappa B</i> , jądrowy czynnik transkrypcyjny
NGF	ang. <i>nerve growth factor</i> , czynnik wzrostu nerwów
NMDA rec.	receptor N-metylo-D-asparaginowy
NMNAT2	ang. <i>nicotinamide mononucleotide adenyltransferase 2</i> , adenylotransferaza mononukleotydu nikotynamidu 2
nNOS	ang. <i>neuronal nitric oxide synthase</i> , neuronalna syntaza azotu
NNT	ang. <i>number needed to treat</i> , wskaźnik używany do porównania skuteczności leków
OATP1B	ang. <i>organic anion transporting protein 1B</i> , białka transportujące aniony organiczne
OCT2	ang. <i>organic cation transporter 2</i> , transporter kationów organicznych 2
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
RFT	reaktywne formy tlenu
SARM1	ang. <i>Sterile alpha and Toll/interleukin receptor (TIR) motif-containing protein 1</i> , sterylne białko 1 zawierające motyw α i TIR
SERT	ang. <i>serotonin transporter</i> , transporter serotoniny
SSRI	ang. <i>selective serotonin reuptake inhibitor</i> , selektywny inhibitor wychwytu zwrotnego serotoniny
THC	Δ 9-tetrahydrokanabinol
TLPD	trójcykliczne leki przeciwdepresyjne
TLR4, TLR9	receptor toll-podobny typu 4; receptor toll-podobny typu 9
TLRs	ang. <i>toll-like receptors</i> , receptory toll-podobne
TMPRSS2	ang. <i>transmembrane protein serine 2</i> , transbłonowa proteaza serynowa 2
TNF- α	ang. <i>tumor necrosis factor α</i> , czynnik martwicy nowotworów
TRP	ang. <i>transient receptor potential channels</i> , kanały przejściowego potencjału
TRPA1	ang. <i>transient receptor potential ankyrin 1</i> , kanał anakirynowy przejściowego potencjału typu 1
TRPM8	ang. <i>transient receptor potential melastatin 8</i> , kanał melastatyny przejściowego potencjału typu 8
TRPV1	ang. <i>transient receptor potential vanilloid-type 1</i> , kanał waniloidowy przejściowego potencjału typu 1
TRPV4	ang. <i>transient receptor potential vanilloid-type 1</i> , kanał waniloidowy przejściowego potencjału typu 4
VGCCs	ang. <i>voltage-gated calcium channels</i> , napięciowo-zależne kanały wapniowe
VGPCs	ang. <i>voltage-gated potassium channels</i> , napięciowo-zależne kanały potasowe
VGSCs	ang. <i>voltage-gated sodium channels</i> , napięciowo-zależne kanały sodowe

Wykaz skrótów związków i leków użytych w badaniach behawioralnych

AMB	ambroksol
AMI	amitryptylina
ARI	aripiprazol
BRX	bromheksyna
CEB	cebranopadol
CEF	ceftriakson
DL	duloksetyna
LAK	lakoamid
MI	minocyklina
MOR	morfina
OXA	oksalipiatyna
PG	pregabalina
SIM	simwastatyna
VEH	grupa kontrolna

SPIS TABEL

TABELA 1. MODULACJA POSZCZEGÓLNYCH KANAŁÓW JONOWYCH PRZEZ LEKI PRZECIWNOWOTWOROWE WYWOŁUJĄCE CIPN.	23
TABELA 2. WPŁYW ARIPIPAZOLU I CEFTRIAKSONU PODAWANYCH ODDZIELNIE I W SKOJARZENIU NA KOORDYNACJĘ RUCHOWĄ ZWIERZĄT MIERZONĄ W TEŚCIE PRĘTA OBROTOWEGO.	150
TABELA 3. WPŁYW MINOCYKLINY, DULOKSETYNY I SKOJARZONEGO PODANIA MINOCYKLINY Z AMBROKSOLEM I DULOKSETYNĄ NA KOORDYNACJĘ RUCHOWĄ MYSZY W TEŚCIE PRĘTA OBROTOWEGO.	152
TABELA 4. WPŁYW LAKOZAMIDU I JEGO SKOJARZONEGO PODANIA Z AMBROKSOLEM I PREGABALINĄ NA KOORDYNACJĘ RUCHOWĄ MYSZY W TEŚCIE PRĘTA OBROTOWEGO.	153

SPIS RYCIN

RYCINA 1. NEUROPATIA OBWODOWA INDUKOWANA CHEMIOTERAPIĄ.....	19
RYCINA 2. USZKODZENIA I ZMIANY WYWOŁANE PRZEZ RÓŻNE LEKI PRZECIWNOWOTWOROWE.....	20
RYCINA 3. REKOMENDACJE LECZENIA BÓLU NEUROPATYCZNEGO WG [152].....	32
RYCINA 4. MECHANIZMY ZAANGAŻOWANE W ROZWÓJ CIPN INDUKOWANEJ OKSALIPLATYNĄ.....	42
RYCINA 5. SCHEMAT PODSTAWOWEGO PODANIA LEKÓW I ZWIĄZKÓW.....	45
RYCINA 6. SCHEMAT PODANIA WIELOKROTNEGO.....	46
RYCINA 7. SCHEMAT PODANIA PROFILAKTYCZNEGO – PODANIE JEDNORAZOWE.....	47
RYCINA 8. SCHEMAT PODANIA PROFILAKTYCZNEGO – PODANIE WIELOKROTNE.....	47
RYCINA 9. SCHEMAT PODANIA JEDNOCZESNEGO DWÓCH ZWIĄZKÓW.....	48
RYCINA 10. SCHEMAT PODANIA DWÓCH LEKÓW Z ODSTĘPEM CZASOWYM – WYKONANIE POMIARÓW PO 4 H OD PODANIA PIERWSZEGO ZWIĄZKU.....	49
RYCINA 11. SCHEMAT PODANIA DWÓCH LEKÓW Z ODSTĘPEM CZASOWYM – WYKONANIE POMIARÓW PO 6 H OD PODANIA PIERWSZEGO ZWIĄZKU.....	50
RYCINA 12. SCHEMAT PODANIA DWÓCH LEKÓW Z ODSTĘPEM CZASOWYM – WYKONANIE POMIARÓW PO 12 H OD PODANIA PIERWSZEGO ZWIĄZKU.....	51
RYCINA 13. WPŁYW OKSALIPLATYNY PODAWANEJ DOOTRZEWNOWO NA CZAS WYSTĄPIENIA REAKCJI BÓLOWEJ U MYSZY.....	56
RYCINA 14. WPŁYW DULOKSETYNY (10 I 30 MG/KG, I.P.) PODAWANEJ JEDNORAZOWO I WIELOKROTNIE NA PRÓG BÓLOWY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	58
RYCINA 15. WPŁYW DULOKSETYNY (10 I 30 MG/KG, I.P.) PODAWANEJ PROFILAKTYCZNIE JEDNORAZOWO NA PRÓG BÓLOWY ZWIERZĄT MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	61
RYCINA 16. WPŁYW DULOKSETYNY (10 I 30 MG/KG, I.P.) PODAWANEJ WIELOKROTNIE PROFILAKTYCZNIE NA PRÓG BÓLOWY ZWIERZĄT MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	64
RYCINA 17. WPŁYW PREGABALINY (10 I 30 MG/KG, I.P.) NA PRÓG BÓLOWY ZWIERZĄT MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI.....	66
RYCINA 18. WPŁYW AMITRYPTYLINY (1, 2.5 I 10 MG/KG, I.P.) NA PRÓG BÓLOWY ZWIERZĄT MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI.....	67
RYCINA 19. WPŁYW LAKOZAMIDU (10 I 30 MG/KG, I.P.) NA PRÓG BÓLOWY ZWIERZĄT MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	69
RYCINA 20. WPŁYW CEBRANOPADOLU (10 MG/KG, S.C.) I MORFINY (10 MG/KG, S.C.) NA PRÓG BÓLOWY ZWIERZĄT MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI.....	72
RYCINA 21. WPŁYW AMBROKSOLU (12.5 I 37.5 MG/KG, I.V.) NA PRÓG BÓLOWY ZWIERZĄT MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI.....	74
RYCINA 22. WPŁYW AMBROKSOLU (90 I 150 MG/KG, I.P.) PODAWANEGO JEDNORAZOWO I WIELOKROTNIE NA PRÓG BÓLOWY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	76
RYCINA 23. WPŁYW AMBROKSOLU (90 I 150 MG/KG, I.P.) PODAWANEGO JEDNORAZOWO PROFILAKTYCZNIE NA PRÓG BÓLOWY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	79
RYCINA 24. WPŁYW AMBROKSOLU (90 I 150 MG/KG, I.P.) PODAWANEGO WIELOKROTNIE PROFILAKTYCZNIE NA PRÓG BÓLOWY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	82
RYCINA 25. WPŁYW BROMHEKSYNY (90 I 150 MG/KG, I.P.) PODAWANEJ JEDNORAZOWO I WIELOKROTNIE NA PRÓG BÓLOWY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	86

RYCINA 26. WPŁYW BROMHEKSYNY (90 I 150 MG/KG, I.P.) PODAWANEJ JEDNORAZOWO PROFILAKTYCZNIE NA PRÓG BÓLOWY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	89
RYCINA 27. WPŁYW BROMHEKSYNY (90 I 150 MG/KG, I.P.) PODAWANEJ WIELOKROTNIE PROFILAKTYCZNIE NA PRÓG BÓLOWY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	92
RYCINA 28. WPŁYW ARIPIRAZOLU (1 I 10 MG/KG, I.P.) PODAWANEGO JEDNORAZOWO I WIELOKROTNIE NA PRÓG BÓLOWY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	95
RYCINA 29. WPŁYW CEFTRIAKSONU (50 I 200 MG/KG, I.P.) PODAWANEGO JEDNORAZOWO I WIELOKROTNIE NA PRÓG BÓLOWY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).	98
RYCINA 30. WPŁYW BEFIRADOLU (1.25, 2.5 I 5 MG/KG, I.P.) NA PRÓG BÓLOWY ZWIERZĄT MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).	101
RYCINA 31. WPŁYW SIMWASTATYNY (100 MG/KG, P.O.) PODAWANEJ JEDNORAZOWO I WIELOKROTNIE (7 DNI) NA PRÓG BÓLOWY ZWIERZĄT MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI.	102
RYCINA 32. WPŁYW SIMWASTATYNY (100 MG/KG, P.O.) PODAWANEJ WIELOKROTNIE (14 DNI) NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI.	103
RYCINA 33. WPŁYW MINOCYKLINY (50 I 100 MG/KG, I.P.) PODAWANEJ JEDNORAZOWO I WIELOKROTNIE NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	105
RYCINA 34. WPŁYW DULOKSETYNY (10 I 30 MG/KG, I.P.) W POŁĄCZENIU Z AMBROKSOLEM (90 MG/KG, I.P.) PODAWANYCH W SCHEMACIE CDT NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).	108
RYCINA 35. WPŁYW DULOKSETYNY (10 I 30 MG/KG, I.P.) PO 1 H, 4 H, 6 H I 12 H OD PODANIA NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	111
RYCINA 36. WPŁYW PREGABALINY (10 I 30 MG/KG, I.P.) W POŁĄCZENIU Z AMBROKSOLEM (12.5 MG/KG, I.V.) PODAWANYCH W SCHEMACIE CDT NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI.	114
RYCINA 37. WPŁYW PREGABALINY (10 MG/KG, I.P., A) ORAZ AMBROKSOLU (12.5 I 37.5 MG/KG, I.V., B) PO 0.5/1 H, 4 H, 6 H I 12 H OD PODANIA NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI.	116
RYCINA 38. WPŁYW AMBROKSOLU (12.5 I 37.5 MG/KG, I.V.) W POŁĄCZENIU Z AMITRYPTYLINĄ (1 MG/KG, I.P.) PODAWANYCH W SCHEMACIE CDT NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI.	118
RYCINA 39. WPŁYW LAKOZAMIDU (10 I 30 MG/KG, I.P.) W POŁĄCZENIU Z AMBROKSOLEM (90 MG/KG, I.P.) PODAWANYCH W SCHEMACIE CDT NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).	121
RYCINA 40. WPŁYW PREGABALINY (10 I 30 MG/KG, I.P.) W POŁĄCZENIU Z LAKOZAMIDEM (10 MG/KG, I.P.) PODAWANYCH W SCHEMACIE CDT NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).	124
RYCINA 41. WPŁYW ARIPIRAZOLU (1 I 10 MG/KG, I.P.) W POŁĄCZENIU Z CEFTRIAKSONEM (50 I 200 MG/KG, I.P.) PODAWANYCH JEDNORAZOWO I WIELOKROTNIE NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	127
RYCINA 42. WPŁYW WIELOKROTNEGO PODANIA SIMWASTATYNY (100 MG/KG, P.O.) W POŁĄCZENIU Z CEBRANOPADOLEM (10 MG/KG, S.C.) PRZEBADANYCH SIÓDMEGO DNIA EKSPERYMENTU: PO 2 H OD PODANIA JEDNOCZESNEGO (A), ORAZ Z ODSTĘPEM CZASU 4 H (B) I 6 H (C) NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI.	130

RYCINA 43. WPŁYW MINOCYKLINY (50 I 100 MG/KG, I.P.) W POŁĄCZENIU Z AMBROKSOLEM (90 MG/KG, I.P.) PODAWANYCH W SCHEMACIE CDT NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).	133
RYCINA 44. WPŁYW MINOCYKLINY (50 I 100 MG/KG, I.P.) W POŁĄCZENIU Z DULOKSETYNĄ (10 MG/KG, I.P.) PODAWANYCH W SCHEMACIE CDT NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).	136
RYCINA 45. WPŁYW MINOCYKLINY (50 MG/KG, I.P.) W POŁĄCZENIU Z DULOKSETYNĄ (10 MG/KG, I.P.) I AMBROKSOLEM (90 MG/KG, I.P.) PODAWANYCH JEDNORAZOWO I WIELOKROTNIE NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) I TEŚCIE VON FREYA (B).....	140
RYCINA 46. WPŁYW MINOCYKLINY (50 I 100 MG/KG, I.P.) PO 1 H, 4 H, 6 H I 12 H OD PODANIA NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY MIERZONY W TEŚCIE ZIMNEJ PŁYTKI (A) ORAZ TEŚCIE VON FREYA (B).	143
RYCINA 47. WPŁYW PREGABALINY (10 I 30 MG/KG, I.P.), AMBROKSOLU (12.5 I 37.5 MG/KG, I.V.) ORAZ POŁĄCZENIA PREGABALINY I AMBROKSOLU NA AKTYWNOŚĆ LOKOMOTORYCZNA U MYSZY.....	146
RYCINA 48. WPŁYW AMBROKSOLU I BROMHEKSYNY (90 I 150 MG/KG, I.P.) NA KOORDYNACJĘ RUCHOWĄ U MYSZY.	147
RYCINA 49. WPŁYW ARIPIPRAZOLU (1 I 10 MG/KG, I.P.) I CEFTRIAKSONU (50 I 200 MG/KG, I.P.) NA AKTYWNOŚĆ LOKOMOTORYCZNA U MYSZY.	149
RYCINA 50. PROTOTYP ANALGEZYMETRU WYKORZYSTANEGO W EKSPERYMENCIE DO OCENY PREFERENCJI TERMICZNYCH ZWIERZĄT.....	154
RYCINA 51. WPŁYW OKSALIPLATYNY, DULOKSETYNY I PREGABALINY NA TERMICZNA PREFERENCJĘ U MYSZY.	157

1 WSTĘP

1.1 BÓL NEUROPATYCZNY

Ból neuropatyczny (ang. *neuropathic pain*) definiowany jest przez Międzynarodowe Towarzystwo Badań nad Bólem (ang. *International Association for the Study of Pain, IASP*) jako „ból spowodowany zmianą lub chorobą somatosensorycznego układu nerwowego” [1]. Zmiany lub choroby obejmujące tę część układu nerwowego mogą nie tylko prowadzić do utraty funkcji, ale również do zwiększonej wrażliwości na ból (hiperalgezia, allodynia) czy wystąpienia bólu spontanicznego (o charakterze ciągłym lub epizodycznym) [2]. Zaburzenia w funkcjonowaniu mogą dotyczyć zarówno uszkodzeń ośrodkowego, jak i obwodowego układu nerwowego. Ból neuropatyczny ma zwykle charakter bólu przewlekłego, czyli wrażenia bólowe utrzymują się bądź nawracają co najmniej przez 3 miesiące [3].

Klinicznie obserwuje się różne objawy neuropatii. Może ona występować w formie ogniskowej albo rozlanego uszkodzenia obwodowych nerwów, jak również uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Kluczową cechą diagnostyczną jest współwystępowanie różnych objawów czuciowych, tj. pozytywnych i negatywnych objawów somatosensorycznych. Objawy pozytywne obejmują zarówno odczucia bolesne, jak i niebolesne, takie jak parastezję czy ból spontaniczny. Z kolei objawy negatywne charakteryzują się deficytem czuciowym w odpowiedzi na działanie bodźca szkodliwego i termicznego, wskazując na uszkodzenie włókien doprowadzających o małej średnicy (włókna C- i A δ), [4]. Charakterystycznym objawem, szczególnie uciążliwym dla osób cierpiących z powodu neuropatii, jest rozwój nadwrażliwości na różne bodźce. Najczęściej występuje nadwrażliwość mechaniczna, rzadziej rozwija się nadwrażliwość termiczna (na niską i wysoką temperaturę). Wyróżniamy dwa rodzaje nadwrażliwości: allodynię i hiperalgezie [4].

Allodynia definiowana jest jako „ból spowodowany bodźcem, który zwykle nie wywołuje bólu”, wynikający prawdopodobnie z „błędu” w przewodnictwie neuronalnym. Etiologia i patogeneza tego zaburzenia nie jest znana [5]. Hiperalgezia definiowana jest jako „nienormalna (zwiększona) wrażliwość na ból w odpowiedzi na działanie bodźca nocyceptywnego” [6]. Może pojawić się w wyniku rozwijającej się choroby zapalnej (np. w reumatoidalnym zapaleniu stawów). Określa się ją wtedy mianem pierwotnej hiperalgezji bólowej i uważa się, że wynika z nadwrażliwości nocyceptorów. Natomiast hiperalgezia pojawiająca się m.in. w trakcie rozwoju bólu neuropatycznego (np. po przebytych półpaścu), przyrównywana jest z hiperalgezią wtórną i prawdopodobnie wynika z uwrażliwienia centralnego układu nerwowego [7,8].

Jednym z zaburzeń o charakterze bólu neuropatycznego jest neuropatia obwodowa indukowana chemioterapią (ang. *chemotherapy-induced peripheral neuropathy, CIPN*), która jest niepożądaną reakcją uboczną rozwijającą się u osób otrzymujących leki przeciwnowotworowe. W przebiegu CIPN występują objawy o typie neurotoksyczności i wysokiej oporności w leczeniu farmakologicznym [9]. Z uwagi na lekooporność oraz coraz szersze występowanie CIPN, związane ze wzrostem odsetka osób dotkniętych chorobą

nowotworową, w niniejszej pracy doktorskiej skupiono się na różnych aspektach leczenia, profilaktyki oraz mechanizmów odpowiedzialnych za wywołanie CIPN.

1.2 NEUROPATIA OBWODOWA INDUKOWANA CHEMIOTERAPIĄ

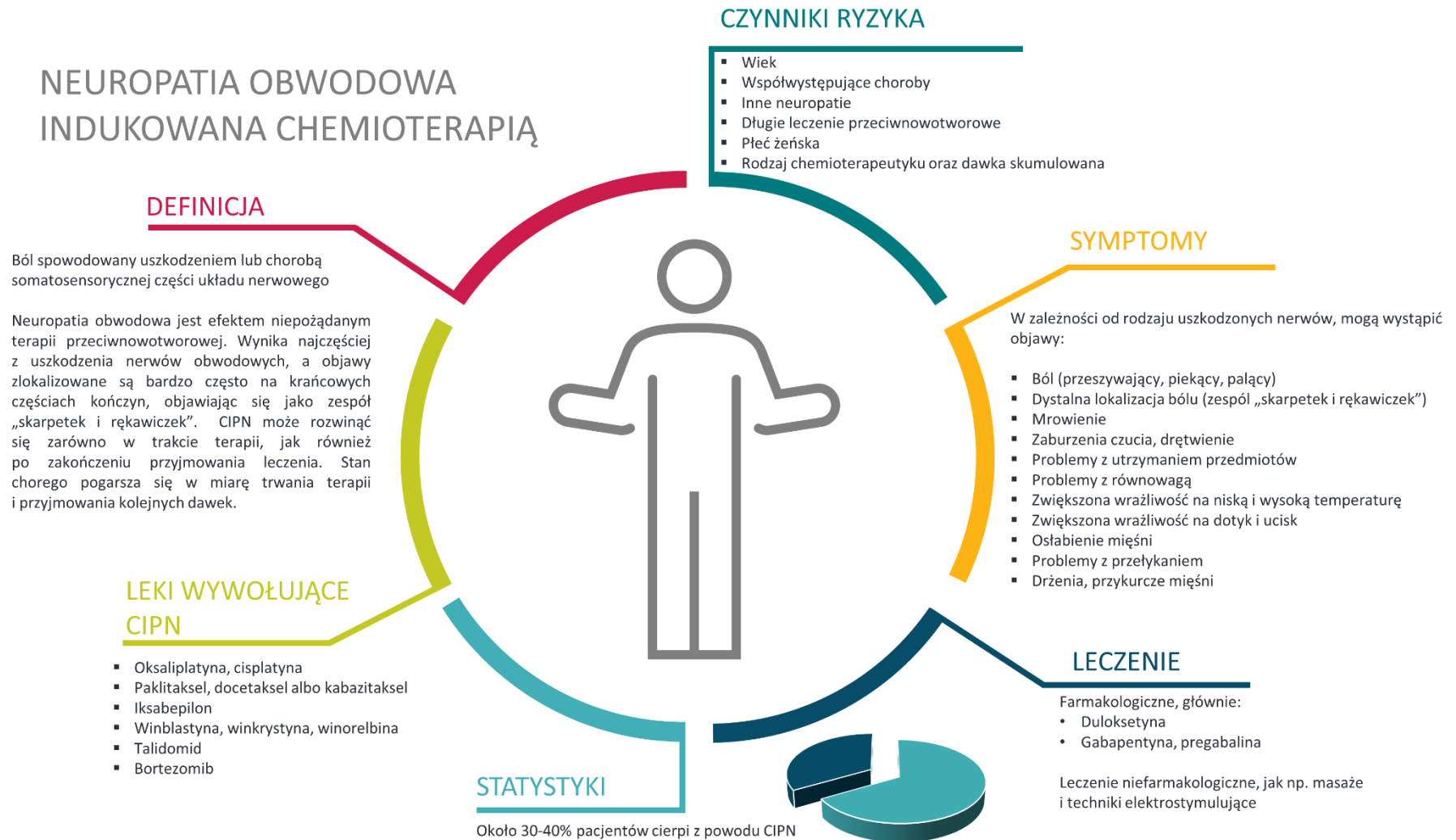
CIPN jest powszechnym i złożonym powikłaniem po przebytej terapii przeciwnowotworowej (Rycina 1). Częstość występowania CIPN jest związana nie tylko ze zwiększoną zapadalnością na choroby onkologiczne, ale również rosnącą skutecznością leczenia i poprawą przeżywalności wśród chorych [10]. Przez wielu klinicystów CIPN uważana jest za akceptowalny efekt uboczny terapii onkologicznej. Jednak z punktu widzenia pacjentów, jest to często skrajnie przykra dolegliwość, która w istotnym stopniu wpływa na jakość życia, a ze względu na charakter wywołanych uszkodzeń może towarzyszyć im przez kilka, a nawet kilkanaście lat [11].

W trakcie terapii przeciwnowotworowej często obserwuje się rozwój ostrej obwodowej neuropatii wywołanej chemioterapią. Jeżeli jej przebieg jest ciężki, może prowadzić to do zaprzestania kontynuowania terapii albo redukcji stosowanej dawki, co z kolei wpływa na skuteczność leczenia onkologicznego i rokowania pacjenta [10,12]. Jednak objawy CIPN nie zawsze występują w trakcie terapii. Mogą pojawić się po zakończonym leczeniu lub narastać w miarę upływu czasu (ang. „*coasting phenomenon*”) [13].

Neuropatia obwodowa, będąca powikłaniem leczenia onkologicznego, związana jest ze stosowaniem takich leków jak: związki platyny (oksalipatyna, cisplatyna), alkaloidy barwinka (winkrystyna), taksany (paklitaksel, docetaksel) oraz inne leki (bortezomib, eribulina, talidomid czy iksabepilon) [12,14]. Dotyka ona około 60–70% pacjentów przyjmujących leki przeciwnowotworowe w ciągu pierwszego miesiąca terapii [12,15,16], a w około 20–30% przypadków może przekształcić się w formę przewlekłą i oporną na leczenie [9]. Objawy CIPN opisywane są przez pacjentów jako silnie nieprzyjemne doznania: przeszywający, piekący, palący ból oraz utrata czucia czy drętwienie kończyn. Dolegliwości te często występują w rejonach dystalnych części kończyn, a następnie w miarę postępu choroby rozszerzają się na ramiona i dalsze części nóg [17,18].

Jednym z głównych czynników ryzyka rozwoju CIPN jest skumulowana dawka leku podana w trakcie terapii (w szczególności w przypadku oksalipatyny i cisplatyny [19]), liczba przyjętych cykli chemioterapii, rodzaj przyjmowanego leku oraz wiek pacjenta [20]. Oprócz wymienionych czynników zwraca się również uwagę na predyspozycje genetyczne, płeć pacjenta, współwystępowanie innych chorób, jak cukrzyca czy otyłość, palenie papierosów i nadużywanie alkoholu [19–21].

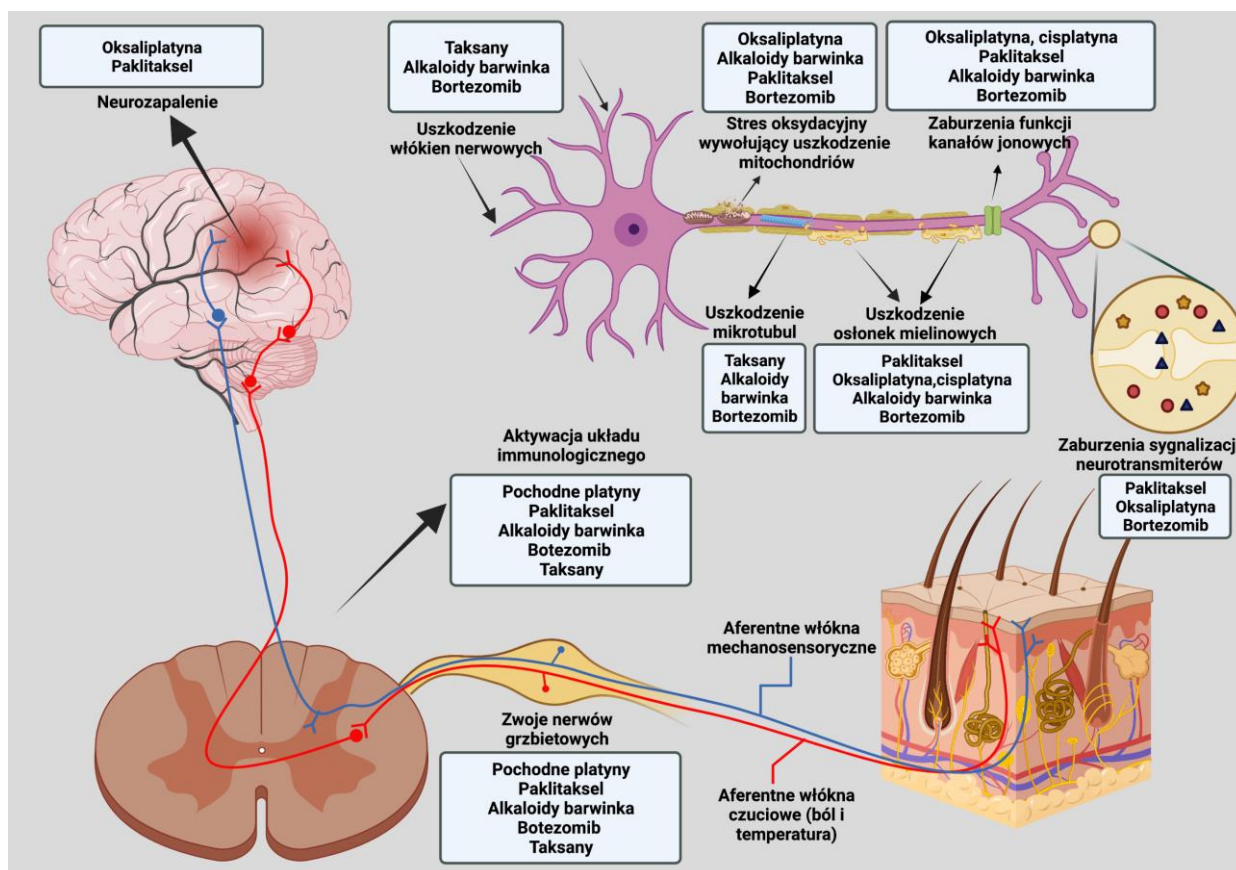
NEUROPATIA OBWODOWA INDUKOWANA CHEMIOTERAPIĄ



Rycina 1. Neuropatia obwodowa indukowana chemioterapią.

1.3 MECHANIZMY USZKODZENIA WYWOŁUJĄCE CIPN

Z uwagi na fakt, iż leki przeciwnowotworowe wywołujące CIPN charakteryzują się bardzo różnym mechanizmem działania, obejmującym: alkilację DNA komórkowego (pochodne platyny), wiązanie z mikrotubulami i zahamowanie podziału komórek (taksany, alkaloidy barwinka), czy hamowanie proteasomu (bortezomib), uszkodzenia i zaburzenia, jakie wywołują w organizmie, są różnorodne. Dlatego też CIPN jest schorzeniem bardzo złożonym, o zróżnicowanym mechanizmie i etiologii (Rycina 2). Najczęściej jako mechanizm rozwoju CIPN wymienia się: stres oksydacyjny, zmienioną pobudliwość nerwów obwodowych poprzez wpływ na napięciowo-zależne kanały (głównie: sodowe, potasowe, wapniowe), stan zapalny i bezpośrednie uszkodzenie układu nerwowego, w tym również zwiększoną produkcję cytokin prozapalnych, aktywację układu neuroimmunologicznego, uszkodzenie mitochondriów i zaburzenia w transporcie neuronalnym oraz homeostazie wapnia [9].



Rycina 2. Uszkodzenia i zmiany wywołane przez różne leki przeciwnowotworowe.

1.3.1 Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny jest istotnym czynnikiem wywołującym CIPN związanym z nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu (RFT). Mitochondria są jednym z głównych endogennych źródeł RFT. W nieuszkodzonych mitochondriach liczba RFT jest ściśle kontrolowana, natomiast podczas terapii przeciwnowotworowej proces ten ulega zaburzeniu [18].

Wykazano, iż w wyniku podawania paklitakselu większość neurotoksycznych uszkodzeń dotyczy zwojów korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych (ang. *dorsal root ganglion*, DRG) i obwodowych nerwów czuciowych. W DRG po podaniu paklitakselu

następował znaczący wzrost aktywności cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej – CuZnSOD i peroksydazy glutationu, a wzrost aktywność mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej – MnSOD obserwowany był wyłącznie w obwodowych nerwach, w których aktywność katalazy pozostawała niezmienną [22]. Świadczy to o tym, iż odpowiedź organizmu na stres oksydacyjny wywołany paklitaksem jest niewystarczająca i dodatkowo występuje z opóźnieniem w stosunku do szybkości zachodzących uszkodzeń w obwodowych nerwach czuciowych [12,22]. Z badań tych wynika, iż mitochondrialne RFT są przyczyną rozwoju i utrzymania CIPN [12].

W przypadku oksaliplatyny istnieje również silne powiązanie pomiędzy stresem oksydacyjnym, a indukowanymi zmianami w przebiegu CIPN. W wyniku dysfunkcji mitochondriów neuronalnych, powstające zmiany i uszkodzenia nie mogą być naprawiane. Dodatkowo oksaliplatyna powoduje uszkodzenia, zarówno neuronalnych, jak i nieneuronalnych mitochondriów, prowadząc do obciążenia stresem oksydacyjnym i zaburzeń homeostazy całego organizmu [23]. W procesie tym pośredniczą kanały przejściowego potencjału TRPA1 (anakirowy; ang. *transient receptor potential ankyrin 1*, TRPA1), przyczyniając się do charakterystycznej indukowanej przez ten cytostatyk nadwrażliwości mechanicznej i termicznej (na niską temperaturę) [9,23,24].

Spośród leków przeciwnowotworowych bortezomib wykazuje znaczący wpływ na funkcje mitochondriów w neuronach czuciowych [25], wywołując neuropatię obwodową poprzez działanie mitotoksyczne [26] oraz indukując glikolizę tlenową [25]. Jest to bardzo ważne z uwagi na fakt, iż CIPN najczęściej dotyka neurony z długimi aksonami [27], które to charakteryzują się znaczącym zapotrzebowaniem energetycznym [25]. Dodatkowo lek ten zakłóca wiele elementów transportu aksonalnego [28] oraz wykazuje silne działania cytotoksyczne [29].

1.3.2 Zaburzona homeostaza wapnia

Zaburzenie homeostazy wapnia jest kolejnym z uszkodzeń wywoływanych przez leki przeciwnowotworowe. Wewnątrzkomórkowe jony wapnia działają jako wtórne przekaźniki wielu ważnych procesów fizjologicznych, w tym: neuroprzebieżnictwa, pobudliwości neuronów, aktywności enzymatycznej, regulacji transkrypcji oraz neuroplastyczności [30–32]. Zaburzenia równowagi wapnia w komórkach nerwowych mogą prowadzić do martwicy i/lub apoptozy, a następnie do udaru i neurodegeneracji [33].

W przypadku oksaliplatyny dużą rolę w zaburzeniu homeostazy wapnia odgrywa szczawian - jeden z metabolitów powstających po podaniu tego leku. Szczawian wykazuje zdolności chelatujące w stosunku do zewnątrzkomórkowych jonów wapnia [34], stąd też jony wapnia i magnezu zostały wykorzystane jako próba profilaktyki CIPN podczas terapii oksaliplatyną [35]. Co więcej, wykazano, że oksaliplatyna może podwyższać poziom wewnątrzkomórkowego wapnia poprzez napięciowo-zależne kanały wapniowe typu L i T w DRG, co wiąże się ze zmianą potencjału czynnościowego i jego charakterystyki. Badania *in vitro* potwierdzają kluczową rolę tych kanałów w neurotoksyczności indukowanej przez oksaliplatynę [36]. Dodatkowo jony wapnia wykazują zdolność modyfikowania właściwości napięciowo-zależnych kanałów sodowych poprzez hiperpolaryzację błony komórkowej [37].

1.3.3 Degeneracja neuronów

Zwyrodnienie aksonów może być wywołane przez wiele różnych czynników. Potencjalne mechanizmy odpowiedzialne za degenerację aksonów w wyniku leczenia onkologicznego są zróżnicowane w zależności od stosowanego preparatu. W przypadku oksaliplatyny udział tego uszkodzenia w generowaniu i narastaniu CIPN jest niejasny. Z jednej strony istnieje możliwość, iż podanie oksaliplatyny prowadzi do zwyrodnienia aksonów i zaburzenia pracy aksonalnej [38], jednak biorąc pod uwagę charakter prezentowanych objawów u pacjentów, które mają tendencję do ustępowania między cyklami oraz mogą całkowicie ustąpić po zaprzestaniu leczenia, sugeruje się udział niedegeneracyjnych mechanizmów w procesie rozwoju bólu indukowanego oksaliplatyną [39].

W przypadku innych leków obserwowany mechanizm jest analogiczny do zwyrodnienia Wallera. W ostatnich latach dokonał się ogromny postęp w zrozumieniu procesu degeneracji neuronów w wyniku ich przecięcia lub zmiżdżenia. Badania, które obejmowały zagadnienie zwyrodnienia Wallera, wykazały, że aksony nie umierają biernie w wyniku braku środków odżywczych, ale aktywują zakodowany w swoich genach program samozniszczenia aksonalnego, który prowadzi do ich fragmentacji. Niedawno odkryto sterylne białko 1 zawierające motyw α i TIR (SARM1), jako niezbędny element opisanego powyżej endogennego szlaku samozniszczenia aksonów. Z badań wynika, iż aktywacja SARM1 jest wystarczająca do wywołania zwyrodnienia zdrowych aksonów [40–42]. Podobny mechanizm obserwowany jest podczas terapii niektórymi lekami przeciwnowotworowymi.

W przypadku neuropatii indukowanej winkrystyną, podanie tego chemioterapeutyku myszom pozbawionym SARM1 powoduje degenerację najbardziej dystalnych aksonów, z zachowaniem funkcjonalności i braku uszkodzenia większych oraz zahamowaniem rozwoju neuropatii obwodowej. Wynika to prawdopodobnie ze zwyrodnienia Wallera, gdzie szlak SARM1 jest aktywowany brakiem doptywu czynnika przeżycia aksonów, czyli adenylotransferazy mononukleotydu nikotynamidu 2 (ang. *nicotinamide mononucleotide adenyltransferase 2*, NMNAT2) [43]. W przebiegu CIPN dochodzi do uszkodzenia transportu aksonalnego, a NMNAT2 szybko się wyczerpuje, co aktywuje szlak SARM1 i indukuje degenerację aksonów [42].

Z kolei działanie neurotoksyczne wywołane przez cisplatynę wymaga aktywacji SARM1, zaangażowanego w zwyrodnienie aksonalne typu Wallera, które poprzedza apoptozę neuronów. W tych warunkach aksony są bardziej podatne na uszkodzenia mitochondrialnego DNA [44]. Cisplatyna dodatkowo może zaburzać plastyczność aksonów i komunikację synaptyczną, co może wystąpić przed uszkodzeniem DNA, regulacją „w dół” czynnika wzrostu nerwów (ang. *nerve growth factor*, NGF) / kinazy receptora tropomiozyny A, uszkodzeniem mitochondriów, utratą ciał komórkowych i apoptozą [45].

W neuropatii obwodowej indukowanej paklitakselem, myszy pozbawione genu SARM1 są odporne na degenerację dystalną aksonów, która występuje w przebiegu CIPN, czy neuropatii metabolicznej [46]. Z badań wynika, iż zwyrodnienie Wallera i zwyrodnienie dystalne aksonów obserwowane, między innymi w neuropatiach indukowanych chemioterapią, mają wspólne szlaki i powiązane mechanizmy, a poszukiwanie leków przeciwdziałających tym uszkodzeniom powinno obejmować hamowanie aktywności SARM1 albo zwiększenie aktywności NMNAT2 [46].

1.3.4 Zaburzenia w pobudliwości neuronalnej

Zaburzenia pobudliwości neuronalnej w obwodowych neuronach czuciowych wymieniane są jako kluczowe uszkodzenia współuczestniczące w rozwoju CIPN. Potencjały czynnościowe są jednym z głównych mierników czynności neuronów, a w celu ich prawidłowej pracy niezbędna jest aktywacja odpowiednich kanałów jonowych. Wśród głównych kanałów jonowych biorących udział w patogenezie CIPN wymienia się: napięciowo-zależne kanały sodowe (ang. *Voltage – gated sodium channels*, VGSCs), napięciowo-zależne kanały wapniowe (ang. *Voltage – gated calcium channels*, VGCCs), napięciowo-zależne kanały potasowe (ang. *Voltage – gated potassium channels*, VGPCs) oraz kanały przejściowego potencjału (ang. *transient receptor potential channels*, TRP), których udział w rozwój CIPN w zależności od cytostatyka przedstawia Tabela 1.

Tabela 1. Modulacja poszczególnych kanałów jonowych przez leki przeciwnowotworowe wywołujące CIPN.

Chemioterapeutyk	Kanały Na ⁺	Kanały K ⁺	Kanały Ca ²⁺	Kanały TRP
Oksaliplatyna	↑ Na _v 1.4 [47]	↓ TREK1 [48,49]	↑ VGCCs typu L [50]	↑ TRPM8 [51]
	↓ Na _v 1.5 [52]	↓ TRAAK [48]	↑ VGCCs typu T [36]	↑ TRPA1 [53]
	↑ Na _v 1.6 [54,55]	↓ K _v 1.1 [48]	↑ α ₂ δ [56]	↑ TRPV1 [57]
	↑ Na _v 1.7 [58]	↓ K _v 2.2 [59]		
	↑ Na _v 1.8 [47]	↑ HCN1 [60]		
	↑ Na _v 1.9 [61]	↑ K _{ir} 3.1 [55,62]		
		↓ TREK2 [63]		
		↓ KCNQ [64,65]		
Cisplatyna		↑Kanały potasowe aktywowane wapniem o dużej przewodności [66,67]	↑ VGCCs typu N [68]	↑TRPV1 [69]
			↕ α ₂ δ [68]	↑TRPA1 [69,70]
			↓ VGCCs typu T [68]	↑TRPM8 [69]
			↓ VGCCs typu L [68]	
			↓ VGCCs typu P/Q[68]	

Paklitaksel	↑ Na _v 1.7 [71,72]	↓ K _{2P} 1.1 [73]	↑ VGCCs typu T [74,75]	↑ TRPA1 [76,77]
	↑ Na _v 1.8 [78]	↓ K _{ir} 1.1 [73]	↑ α ₂ δ [56,79]	↑ TRPV1 [80,81]
		↓ K _{ir} 3.4 [73]		↑ TRPV4 [76,77]
		↑ HCN1 [73]		↑ TRPM8 [82]
		↑ K _v 11.3 [73]		
		↑ K _v 1.2 [73]		
		↑ K _{ir} 3.1 [73]		
Winkrystyna	↑ Na _v 1.6 [83]		↕ α ₂ δ [56]	↑ TRPV1 [84,85]
			↑ VGCCs typu T [86,87]	↑ TRPA1 [88]
				↑ TRPV4 [89]
Bortezomib			↑ VGCCs typu T [90]	↑ TRPV1 [91]
				↑ TRPA1 [92,93]
				↓ TRPM8 [94]

Uwagi: ↑ – regulacja „w górę”, ↓ – regulacja „w dół”, ↕ – brak zmiany. Skróty: VGCC – ang. *Voltage-gated calcium channels*, napięciowo–zależne kanały wapniowe; TRP kanały – ang. *transient receptor potential channels*, kanały przejściowego potencjału, TRPA1 – anakirynowy typu 1, TRPM8 – melastatynowy typu 8, TRPV4 – waniloidowy typu 4, TRPV1 – waniloidowy typu 1.

Oksaliplatyna jest lekiem indukującym liczne zmiany w funkcjonowaniu kanałów VGPCs, VGSCs, VGCCs i TRP [55]. W przypadku VGSCs uważa się, że w rozwoju neuropatii obwodowej indukowanej oksaliplatyną kluczową rolę odgrywają kanały Na_v1.6. Do tej pory udowodniono udział tych kanałów w generowaniu nieprawidłowej spontanicznej aktywności neuronalnej po uszkodzeniu nerwów [95] oraz w allodynii termicznej indukowanej niską temperaturą [54]. W przypadku CIPN indukowanej oksaliplatyną blokowanie kanałów Na_v1.6 łagodziło ból neuropatyczny [96]. Zostało to potwierdzone w badaniach własnych, w których podanie ambroksolu, hamującego VGSCs redukowało objawy bólowe u myszy [97]. Pośredni wpływ w indukcję zaburzeń funkcjonowania kanałów VGSCs wykazuje również szczawian, zmieniając ich aktywność i prowadząc do nadpobudliwości neuronów czuciowych [98].

Oksaliplatyna wykazuje szeroki zakres aktywności w stosunku do VGPCs. Jedną z najbardziej widocznych zmian jest drastyczne zmniejszenie aktywności kanałów TREK/TRAAK, które zaliczane są do rodziny mechano- i termoczułych kanałów [49]. W przypadku takich kanałów jak kanały aktywowane hiperpolaryzacją (HCNs), prowadzi do zwiększenia ich ekspresji, a podanie inhibitora kanałów HCNs – iwabradyny, znosi nadwrażliwość na niską temperaturę [48]. Dodatkowo oksaliplatyna w połączeniu z chłodzeniem spowalnia kinetykę aktywacji aksonalnych wolnych kanałów potasowych (Kv7), które regulują pobudliwość neuronów [99,100].

W przypadku kanałów wapniowych oksaliplatyna przyczynia się do zwiększenia ekspresji VGCCs. Szczególnie istotną rolę w indukowaniu neurotoksyczności i CIPN wykazują kanały VGCCs typu T i L [36]. Dodatkowo oksaliplatyna wpływa na zwiększoną ekspresję mRNA podjednostki $\alpha_2\delta$ -1 VGCCs w DRG [56] i rdzeniu kręgowym u szczurów [101]. Wzrost ekspresji mRNA i białka podjednostki $\alpha_2\delta$ -1 następuje już po 2 i 4 dniach od podania cytostatyka i prawdopodobnie funkcjonalnie odpowiada to rozwojowi ostrej fazy nadwrażliwości na zimno [101].

Rodzina kanałów przejściowego potencjału TRP odgrywa istotną rolę w CIPN. Z uwagi na fakt, iż oksaliplatyna wywołuje zarówno nadwrażliwość mechaniczną oraz termiczną indukowaną niską temperaturą, głównie skupiono się na badaniu kanałów zaangażowanych w te procesy, takich jak TRPV1, TRPA1 i TRPM8, które charakteryzuje wzrost ekspresji mRNA po ekspozycji na oksaliplatynę w DRG [53,69]. Dwa spośród tych kanałów jonowych: TRPA1 i TRPM8 uważa się za kluczowe w rozwoju nadwrażliwości termicznej i określa mianem wrażliwych na niską temperaturę kanałów jonowych [102].

Podanie antagonisty kanałów TRPA1 prowadzi do zablokowania tych kanałów, redukując nadwrażliwość na niską temperaturę we wczesnej fazie CIPN [103]. Dodatkowo zwiększona ekspresja TRPA1 związana jest z aktywacją kinazy białkowej aktywowanej mitogenem p38 (ang. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK). Podanie inhibitora p38 MAPK znacząco zmniejsza ostrą nadwrażliwość na zimno indukowaną oksaliplatyną. Świadczy to o prawdopodobnym udziale aktywacji p38 MAPK w regulacji „w górę” kanałów TRPA1 podczas CIPN [104]. Dodatkowo uważa się, że oksaliplatyna lub jeden z jej metabolitów może hamować fosforylację reszty proliny w TRPA1, co indukuje uczulenie TRPA1 na RFT, a tym samym prowadzi do rozwoju nadwrażliwości termicznej [53].

Do niedawna uważano, że kanały TRPV1 nie uczestniczą w rozwoju CIPN indukowanej przez oksaliplatynę ze względu, iż kanały te aktywowane są pod wpływem wysokich temperatur (>43°C), a taka nadwrażliwość termiczna w przypadku oksaliplatyny nie jest obserwowana. Jednak zablokowanie kanałów TRPV1 prowadzi do analgezji i hamowania bólu wywołanego przez ten cytostatyk, w szczególności nadwrażliwości na bodźce mechaniczne [105]. Szeroko stosowana w leczeniu bólu neuropatycznego pregabalina ogranicza indukowaną przez oksaliplatynę neurotoksyczność oksydacyjną, w której pośredniczą kanały TRPV1 [106].

1.3.5 Aktywacja układu odpornościowego i zapalenia w obrębie układu nerwowego

Obwodowe neurony czuciowe są szczególnie narażone na uszkodzenia podczas terapii przeciwnowotworowej. Związane jest to z wieloma czynnikami, w tym między innymi z brakiem skutecznej bariery naczyniowo-nerwowej ograniczającej przenikanie różnych substancji uszkodzających, w tym chemioterapeutyków oraz skomplikowanym i niewystarczającym procesem regeneracji i naprawy uszkodzonych nerwów czuciowych [107,108].

Leki przeciwnowotworowe wywierają ogólnoustrojowy wpływ na organizm, w tym również wykazują efekt immunomodulujący. W większości przypadków efekt ten polega na przejściowym działaniu immunosupresyjnym, aczkolwiek liczne badania sugerują również możliwość stymulowania układu odpornościowego, wspomagając zabijanie komórek

nowotworowych poprzez limfocyty T [108–110]. Obserwuje się również zwiększone stężenie cytokin prozapalnych u osób przyjmujących chemioterapię [108]. Dane te sugerują, iż zapalenie w obrębie układu nerwowego jest jednym z czynników przyczyniających się do rozwoju CIPN. Wiąże się ono z infiltracją komórek układu immunologicznego, aktywacją komórek glejowych i zwiększoną produkcją mediatorów stanu zapalnego w układzie nerwowym [18,108].

W badaniach na zwierzętach po podaniu oksaliplatyny wykazano brak indukowania ogólnoustrojowej immunosupresji oraz wywołanie korzystnej przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej [111]. Interesującym zjawiskiem wywoływanym przez oksaliplatynę jest aktywacja układu odpornościowego, która jest potencjalnie zagrażającym życiu działaniem niepożądanym. W przypadku ponownej terapii występuje trzykrotnie wcześniej [112]. Porównując wpływ leków przeciwnowotworowych na układ immunologiczny, można zauważyć, iż: winkrystyna indukuje rozregulowanie głównie genów związanych z procesami układu odpornościowego, cisplatyna prowadzi do mieszanych zmian związanych z zapaleniem i neuropatią, natomiast oksaliplatyna rozregulowuje geny związane z funkcją neuronów [113].

1.3.5.1 Cytokiny

Uwalnianie się cytokin prozapalnych i chemotaktycznych (chemokin) jest jedną ze zmian występujących podczas terapii onkologicznej. Cytokiny indukują stan zapalny w obrębie czuciowego układu nerwowego oraz nasilają ból wynikający z neuropatii. Podanie cytostatyków powoduje zwiększoną produkcję i uwalnianie takich cytokin jak: czynnik martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), interleukin (IL): IL-1 β i IL-6 oraz chemokin, jak: IL-8 i białka chemoatraktantu monocytów 1 (ang. *monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1, CCL2) [114,115]. Oprócz wywoływania stanu zapalnego, cytokiny prozapalne wykazują również zdolność bezpośredniego oddziaływania na neurony oraz mikro- i makrogłej, który odgrywa ważną rolę w patogenezie CIPN [115,116]. Zwiększona produkcja cytokin prozapalnych powoduje jednocześnie obniżenie poziomu cytokin przeciwzapalnych. Co więcej, produkcja różnego rodzaju chemokin również ulega zwiększaniu. Podwyższa się stężenie takich chemokin jak: MCP-1, białko chemotaktyczne eozynofilii; chemokina 11 (CCL11), białko zapalne makrofagów-1 β (MIP-1 β , CCL4), białko zapalne makrofagów-1 α (MIP-1 α , CCL3), fraktalkina (CX3CL1) [108,117,118].

Jedną z kluczowych chemokin w patogenezie CIPN jest prawdopodobnie chemokina CCL2, której stężenie wraz z receptorem dla tej chemokiny rośnie w neuronach DRG, w szczególności w przypadku CIPN indukowanej paklitakselem [12,117,119]. MCP-1 jest uwalniania z neuronów oraz aktywowanych astrocytów i przypuszczalnie przyczynia się do powstawania bólu neuropatycznego [120]. Zwiększone stężenie tej chemokiny prowadzi do infiltracji makrofagów do DRG i rozwoju objawów klinicznych CIPN [121]. Paklitaksel powoduje również regulację „w górę” stężenia cytokin prozapalnych jak: TNF- α , interferonu- γ (IFN- γ), CCL11, CCL4, CCL3, IL-12p70 oraz czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) w rdzeniu kręgowym [117].

Po podaniu oksaliplatyny obserwuje się wzrost stężenia CCL2/CCR2 już po 4 h od podania, osiągając szczyt czwartego dnia. Natomiast zastosowanie przeciwciał przeciwko

CCL2 chroni przed rozwojem nadwrażliwości mechanicznej [118]. Oksaliplatyna powoduje dodatkowo znaczący wzrost stężenia TNF- α , IL-1 β , MCP-1 i MIP-1 α w rogach grzbietowych kręgosłupa, natomiast podanie melatoniny prowadzi do zahamowania produkcji tych cytokin oraz zmniejszenia intensywności reakcji bólowych w modelu bólu neuropatycznego indukowanego oksaliplatyną. Może to sugerować, iż melatonina wykazuje bezpośredni efekt na indukowany przez ten cytostatyk rozwój stanu zapalnego w układzie nerwowym [122].

Po podaniu winkrystyny obserwuje się interakcję pomiędzy receptorami CX3CR1 i CCR2 w monocytach. Odpowiada ona za efekt terapeutyczny antagonisty CCR2 u myszy z niedoborem CX3CR1. Oddziaływanie pomiędzy CX3CR1 i CCR2 *in vitro* reguluje uwalnianie cytokin biorących udział w generowaniu bólu tj.: TNF- α i IL-1 β . Świadczy to o kluczowym udziale CCL2 i CCR2 w indukowanej przez winkrystynę allodynii u myszy pozbawionych receptorów CX3CR1 [123].

1.3.5.2 Immunologiczne ligandy i receptory

Receptory toll-podobne (ang. *toll-like receptors*, TLRs) jest to rodzina receptorów błonowych, odgrywających kluczową rolę w odpowiedzi odpornościowej nieswoistej (wrodzonej). Odpowiedzialne są za rozpoznawanie wzorców molekularnych atakujących patogenów (np. lipopolisacharyd, LPS) albo błędnie zlokalizowanych bakterii komensalnych. Receptory te wykazują również zdolność rozpoznawania endogennych cząsteczek organizmu powstających podczas reakcji na niebezpieczeństwo, w takich sytuacjach jak: stres komórkowy, zapalenie czy infekcja [124,125].

Liczne badania wykazały udział receptora toll-podobnego typu 4 (TLR4) w bólu neuropatycznym, poprzez indukcję zmiany we wrażliwości bólowej u samców i samic myszy. Badania Sorge RE i wsp. [126] udowodniły, iż aktywacja tych receptorów w rdzeniu kręgowym przez LPS powoduje silną allodynię mechaniczną, wyłącznie u samców [126]. Zastosowanie antagonisty TLR4 może okazać się ciekawą alternatywą leczenia bólu neuropatycznego oraz jedną z opcji modyfikujących przebieg neuropatii [127,128].

Podanie paklitakselu prowadzi do podwyższenia ekspresji TLR4 w DRG i rdzeniu kręgowym. Dodatkowo zastosowanie antagonisty TLR4 wywołało przejściowe odwrócenie nadwrażliwości mechanicznej [129]. Podobnie w przypadku CIPN indukowanej winkrystyną myszy pozbawione receptora TLR4 charakteryzowały się zmniejszoną nadwrażliwością mechaniczną oraz naciekiem komórek odpornościowych. Z kolei podanie minocykliny prowadziło do złagodzenia objawów nadwrażliwości [130]. Zmiany morfologiczne w komórkach TLR4 wywoływała również oksaliplatyna [131].

Okazuje się, że układ immunologiczny odgrywa istotną rolę w różnicach percepcji bólu w zależności od płci. U samic podobny poziom nadwrażliwości bólowej osiągnąć jest prawdopodobnie z udziałem immunologicznych komórek adaptacyjnych, jak limfocyty T, w przeciwieństwie do samców, u których podanie minocykliny wywoływało efekt terapeutyczny z udziałem innych mechanizmów [132]. Dodatkowo w sytuacji niedoboru odporności samice wykazują zdolność przejścia na szlak zależny od receptora toll-podobnego typu 9 (TLR9) w CIPN. Może to sugerować, iż krzyżowa komunikacja pomiędzy komórkami immunologicznymi może przyczyniać się do rozwoju dymorfizmu płciowego. Ponadto u samic

występuje możliwość „przełączenia” się do samczych szlaków neuroimmunologicznych, w tym sygnalizacji przez makrofagi [133].

1.3.5.3 Komórki układu immunologicznego

1.3.5.3.1 Limfocyty T

Limfocyty T biorą udział w procesie powrotu do zdrowia i ustępowania objawów związanych z neuropatią indukowaną chemioterapią. W przypadku neuropatii obwodowej indukowanej cisplatyną i paklitakselem to komórki T CD8 są niezbędne do szybkiej rekonwalescencji pacjentów [134,135]. Prawdopodobnie uczestniczą one w zwiększeniu ekspresji receptora dla IL-10 w DRG, co ogranicza spontaniczne nieprawidłowe wyładowania wywołane przez paklitaksel, ułatwia powrót do zdrowia oraz ogranicza rozwój CIPN [135].

Mechanizm łagodzenia bólu poprzez limfocyty T jest nie do końca jasny. Z jednej strony mogą wpływać na uwalnianie/produkcję IL-10, która okazuje się ważna w procesie rekonwalescencji pacjentów onkologicznych [135,136]. Z drugiej strony, oprócz cytokin limfocyty T, uwalniają również endogenne substancje przeciwbólowe (endogenne opioidy) [137–139]. Analgetyczne działanie endogennych opioidów wytwarzanych przez limfocyty T wynika ze zdolności do produkcji i uwalniania peptydów opioidowych w uszkodzonym nerwie [140]. Z kolei myszy z niedoborem limfocytów T wykazują ograniczony efekt terapeutyczny po podaniu morfiny i charakteryzują się niedoborem endogennej analgezji, w której pośredniczą opioidy [141].

W modelu cisplatynowym limfocyty T CD8 okazały się kluczowe nie tylko w łagodzeniu allodynii mechanicznej, ale również znoszeniu bólu spontanicznego, drętwienia oraz redukcji śródkórnej gęstości włókien nerwowych niezależnie od płci [134]. Dodatkowo podanie cisplatyny wywoływało edukację limfocytów T CD8, co można w przyszłości wykorzystać w celu łagodzenia objawów CIPN poprzez wykorzystanie komórek odpornościowych jako terapii profilaktycznej [134,136].

1.3.5.3.2 Astrocyty

Przez długi czas uważano, iż podanie leków przeciwnowotworowych wywołuje aktywację mikrogleju, jednak w świetle ostatnich odkryć to aktywacja astrocytów wydaje się odpowiedzialna za rozwój neuropatii i działanie uboczne terapii onkologicznej. W indukcji bólu neuropatycznego uczestniczą liczne cząsteczki sygnałowe związane z astrocytami oraz neuromodulatory wydzielane przez astrocyty jak: enzymy, mediatory i neuromodulatory, takie jak: cytokiny, transportery, czynniki transkrypcyjne oraz inne cząsteczki sygnalizacyjne [116].

Astrocyty pełnią ważną funkcję w utrzymaniu homeostazy, neuroprotekcji i prawidłowym funkcjonowaniu OUN. Odpowiadają m.in. za: utrzymanie homeostazy glutaminianu, potasu i równowagi wodno-elektrolitowej, pośredniczą w przekazywaniu sygnałów międzykomórkowych, hamują sygnalizację bólową oraz otaczają synapsy, zapewniając im wsparcie strukturalne, izolację synaps i dalszą regulację synaptogenezy poprzez ekspresję cząsteczek adhezyjnych [116].

W neuropatii indukowanej podaniem oksaliplatyny i bortezomibu kluczowa okazuje się aktywacja astrocytów. Po podaniu tych cytostatyków obserwuje się objawy odpowiadające

zmianom behawioralnym wywołanym chemioterapią. Natomiast, zarówno objawy chorobowe, jak i aktywacja astrocytów ulegają złagodzeniu w wyniku podania minocykliny w obu modelach neuropatii sugerując wspólny mechanizm indukcji CIPN [142].

Badania potwierdzają, iż podanie oksaliplatyny prowadzi do rozwoju allodynii i hiperalgezji u szczurów w wyniku hiperaktywacji astrocytów, bez wpływu na komórki mikrogleju; zwiększenie produkcji cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α , IL-1 β oraz zmniejszanie poziomu cytokin neuroprotektoryjnych/przeciwzapalnych jak IL-10, czy IL-4 w rogach grzbietowych rdzenia kręgowego. Ochronne działanie w modulacji rdzeniowych procesów neurozapalnych mają agonści receptora adenozyliny A₃, których zastosowanie łagodzi objawy CIPN [143].

Podanie paklitakselu indukuje szybką i trwałą aktywację astrocytów rdzeniowych bez widocznej aktywacji mikrogleju. W wyniku aktywacji astrocytów zaobserwowano znaczną regulację „w dół” glijowych transporterów dla glutaminianu (GLAST i GLT-1) w rdzeniowych rogach grzbietowych. Podanie minocykliny zapobiegało zarówno aktywacji astrocytów i regulacji „w dół” transporterów glutaminianu [144]. Z kolei inne badania wykazują, iż IL-1 β wydaje się kluczową cząsteczką wydzielaną przez mikroglej w celu zmiany funkcji astrocytów, a eliminacja receptorów dla IL-1 β zapobiega rozwojowi zespołu bólu ostrego indukowanego paklitakselem [145].

1.3.5.3.3 Mikroglej

Mikroglej stanowią rezydentne komórki odpornościowe w OUN, które są bardzo silnie rozgałęzione, mają wiele drobnych, wyjątkowo ruchliwych wypustek skupionych na ciągłym badaniu najbliższego środowiska. W ten sposób mikroglej dba o zachowanie homeostazy, odbierając bodźce zewnątrzkomórkowe, przetwarzając je i reagując w określony sposób [146]. Dodatkowo mikroglej odpowiada za produkcję licznych cząsteczek pro- i przeciwzapalnych w OUN, co jest istotne w patogenezie bólu [147].

W CIPN rola mikrogleju jest złożona i nie do końca poznana. Sugeruje się, iż w wyniku terapii przeciwnowotworowej aktywacji ulegają różne szlaki i struktury, bez aktywacji mikrogleju, a pobudzenie tych komórek zachodzi prawdopodobnie w innych warunkach [117,142,143,148]. Z drugiej strony, istnieją badania dokumentujące zwiększenie aktywności mikrogleju w wyniku padania takich cytostatyków jak: winkrystyna, cisplatyna i paklitaksel [145,149,150].

1.3.6 Neuroprzekaźniki w OUN

1.3.6.1 Serotonina (5-HT)

Serotonina jest ważnym neuroprzekaźnikiem w patofizjologii bólu. W zależności od miejsca działania i podtypu receptora może wykazywać efekt przeciwbólowy lub pronocyceptywny [151]. W przypadku CIPN, niektóre związki wpływające na transmisję serotonergiczną zyskały dużą popularność, stając się jak duloksetyna jednym z leków pierwszego wyboru w leczeniu różnych rodzajów bólu neuropatycznego. Jednak leki z grupy selektywnych inhibitorów wychwyty zwrotnego 5-HT (ang. *selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI) nie są zalecane z uwagi na niską skuteczność terapeutyczną [152,153]. Prowadzi

to do konkluzji, iż 5-HT wydaje się istotna w łagodzeniu bólu neuropatycznego, jako dodatkowa komponenta w terapii, wykazując synergistyczny efekt terapeutyczny [154].

Wykorzystanie selektywnego agonisty receptorów 5-HT_{1A} – befiradolu (związku NLX-112) w różnych modelach bólu u myszy wykazało silne działanie przeciwbólowe w szczególności w modelu bólu tonicznego (skuteczność w mniejszych zastosowanych dawkach; badania własne). W modelu CIPN indukowanej oksaliplatyną w celu osiągnięcia istotnego poziomu analgezji wymagane były wyższe dawki tego związku [155].

W modelu oksaliplatynowym jednym z prawdopodobnych mechanizmów biorących udział w rozwoju CIPN jest aktywacja kinazy mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin kinase*) przez konstytutywnie aktywne receptory 5-HT₆. Zastosowanie odwrotnych agonistów w stosunku do aktywności tych receptorów albo zaburzenie interakcji receptor 5-HT₆/mTOR może okazać się wartościową strategią łagodzenia objawów CIPN [156].

Z kolei w wyniku podania paklitakselu zaobserwowano podwyższenie poziomu receptorów 5-HT₃ w rogu grzbietowym rdzenia kręgowego u szczurów. Co więcej, po podaniu dooportunym antagonisty receptora 5-HT₃ nastąpiło zahamowanie allodynni mechanicznej i termicznej indukowanej niską temperaturą. Świadczy to prawdopodobnie o pronocyceptywnym udziale rdzeniowych receptorów 5-HT₃ i układu serotonergicznego w przebiegu CIPN [157].

Objawy CIPN indukowanej winkrystyną, takie jak allodynia termiczna i nadwrażliwość mechaniczna, ulegają złagodzeniu po podaniu antagonisty receptorów 5-HT_{2A}. Również u myszy pozbawionych tych receptorów nie rozwija się neuropatia pomimo podania tego leku. Dodatkowo poszerzone badania immunologiczne ujawniły wzrost ekspresji receptorów 5-HT_{2A} u zwierząt otrzymujących winkrystynę, co wskazuje, że w modelu winkrystynowym receptory 5-HT_{2A} odgrywają istotną rolę w uwrażliwianiu nocycceptorów obwodowych i rdzeniowym przetwarzaniu bólu [158].

Podsumowując, zastosowanie leków o ogólnym wpływie na przekaźnictwo serotonergiczne wydaje się ważne, jednak niewystarczające w kontekście leczenia bólu neuropatycznego, a modulacja selektywnych receptorów serotoninowych może okazać się skuteczną opcją w poszukiwaniu nowych leków łagodzących objawy CIPN.

1.3.6.2 Noradrenalina (NA)

Noradrenalina wywiera silne działanie przeciwzapalne w OUN [159]. Jako substancja endogenna wykazuje działanie neuroprotektoryjne w przewlekłym bólu [160,161]; hamuje transdukcję bólu poprzez aktywację interneuronów hamujących GABA-ergicznych i glicynergicznych [162]. Ponadto umiejscowienie receptorów α_2 -adrenergicznych w astrocytach jest około 2-3 razy większe niż na innych neuronach [163], przy czym obecność tych receptorów została również wykazana w mikrogleju [164].

Działanie poprzez hamowanie wychwytu zwrotnego NA prowadzi do uzyskania efektu przeciwbólowego głównie poprzez receptory α_2 -adrenergiczne w rogu grzbietowym rdzenia kręgowego. Receptory te są sprzężone z białkiem G (Gi/o), które powoduje hamowanie presynaptycznych VGCCs. Jednocześnie błony komórkowe ulegają hiperpolaryzacji i następuje zmniejszenie pobudliwości [154,165].

Rdzeniowe działanie NA na nadmierne wzbudzenie rogów grzbietowych w neuronach, w odpowiedzi na zimno u szczurów po podaniu oksaliplatyny zostało zbadane po jej podaniu dooponowym razem z agonistami receptorów adrenergicznych: α_2 – klonidyny, α_1 – fenylefryny i β – izoprenaliny. Wykazano, iż hamujące działanie noradrenaliny wynika z aktywacji głównie α_2 i/lub α_1 -adrenoreceptorów [166]. Natomiast podanie duloksetyny – inhibitora wychwytu zwrotnego 5-HT i NA, zależy od przywrócenia zstępującego hamującego układu noradrenergicznego, zwłaszcza w rdzeniu kręgowym, co potwierdza podanie antagonisty receptora α_2 -adrenergicznego, który znosi efekt przeciwbólowy duloksetyny [167]. W innym badaniu zastosowanie fosfolipazy A₂ otrzymanej z jadu pszczelego powodowało łagodzenie allodynni mechanicznej i nadwrażliwości na zimno w modelu CIPN indukowanej oksaliplatyną, a jej skuteczność była blokowana przez antagonistę receptorów α_2 -adrenergicznych oraz wyczerpanie NA w OUN. Podobnego efektu nie osiągnięto poprzez wpływ na układ serotonergiczny [168].

W celu oceny udziału układu noradrenergicznego w patofizjologii CIPN w modelu neuropatii indukowanej paklitakselem zastosowano inhibitora wychwytu zwrotnego NA – reboksetynę, klonidynę (agonistę rec. α_2) i atipemazol (antagonista rec. α_2) oraz zbadano ekspresję enzymu biosyntezy NA: dopaminy- β -hydroksylazy (DBH) w rdzeniowych rogach grzbietowych. Udowodniono, iż po podaniu paklitakselu następuje wzrost poziomu DBH oraz zwiększenie hamowania noradrenergicznego podczas CIPN [169,170].

1.3.6.3 Dopamina (DA)

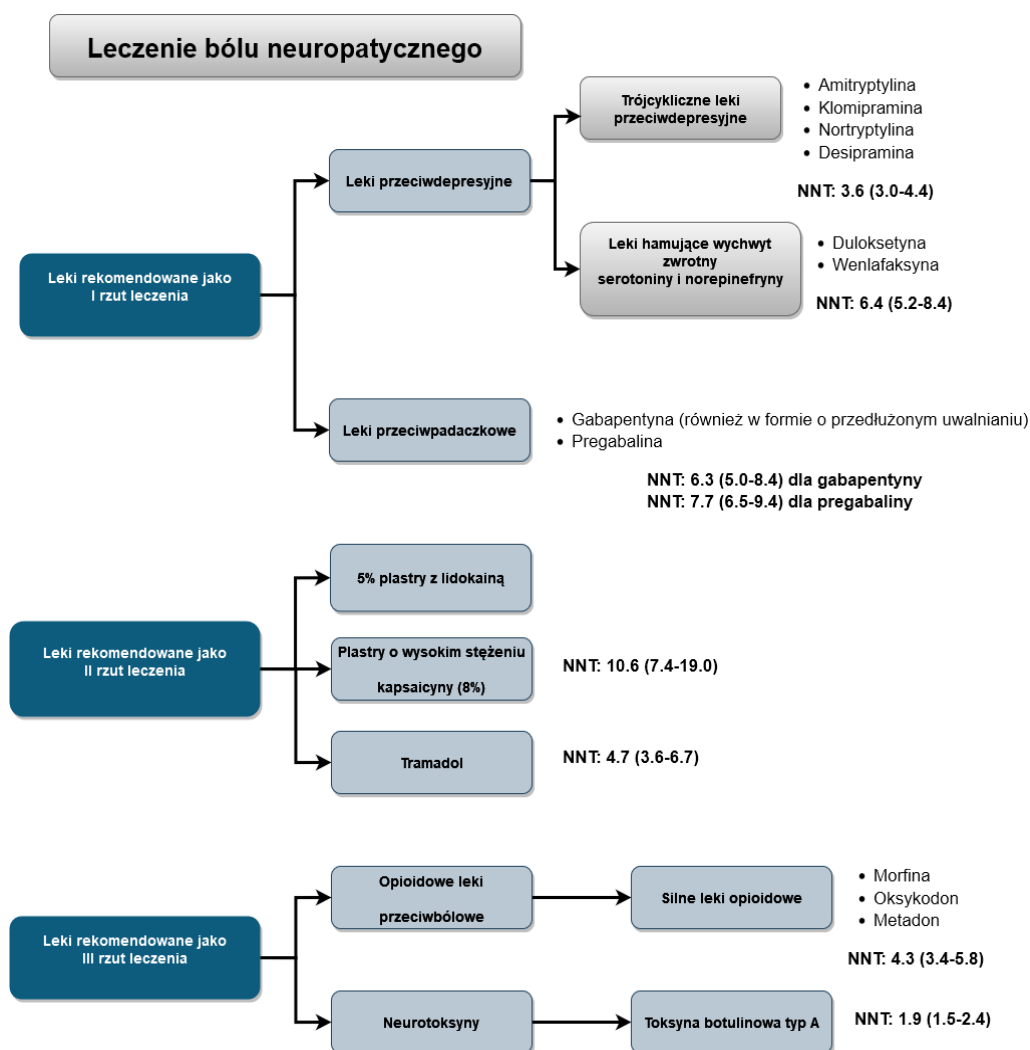
Zaburzenia w funkcjonowaniu układu dopaminergicznego zostały zaobserwowane w modelu bólu neuropatycznego indukowanego mechanicznym uszkodzeniem nerwów (neuropatii obwodowej) w postaci zwiększonej szybkości wyładowań komórek dopaminowych, podwyższonego poziomu DA, zmniejszonej ekspresji receptorów D₂, ale nie D₁, i hydroksylazy tyrozyny w jądrze półleżącym [171]. Jednocześnie istnieją dowody potwierdzające, iż rozwojowi bólu przewlekłego towarzyszy osłabienie transmisji dopaminergicznej, o czym świadczy zmniejszenie: podstawowego zewnątrzkomórkowego poziomu DA w prążkowie, aktywności komórek dopaminergicznych oraz odpowiedzi dopaminergicznej na bodźce uszkodzające i nagradzające [172].

Skuteczność aripiprazolu – częściowego agonisty 5-HT_{1A} oraz modulatora receptorów D₂ została przebadana w modelu oksaliplatynowym [173], oraz winkrystynowym [174]. W obu przypadkach aripiprazol wykazał działanie łagodzące wystąpienie objawów bólu neuropatycznego oraz zapobiegał rozwojowi CIPN. Skuteczność tego leku może wynikać nie tylko z wpływu na układ dopaminergiczny, ale również serotonergiczny, zwiększony poziom neuronalnej syntazy azotu (ang. *neuronal nitric oxide synthase*, nNOS) i hiperaktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego (ang. *nuclear factor kappa B*, NF- κ B) [173,174]. Dodatkowo bupropion, który jest inhibitorem wychwytu zwrotnego DA i NA, wykazał działanie łagodzące nadwrażliwość bólową w modelu bólu neuropatycznego poprzez modulację receptorów α_2 -adrenergicznych i dopaminowych D₂ [175].

1.4 LECZENIE BÓLU NEUROPATYCZNEGO

Leczenie bólu neuropatycznego stanowi wyzwanie współczesnej farmakologii. Z uwagi na różne typy bólu, wynikające z odmiennych mechanizmów i czynników wyzwalających, skuteczność poszczególnych terapii jest zmienna i często niewystarczająca.

Zwrócić należy uwagę na fakt, iż wszystkie wytyczne i rekomendacje dotyczą wyłącznie ogólnego leczenia bólu neuropatycznego. Na chwilę obecną brak jest szczegółowych rekomendacji dotyczących leczenia bólu w przebiegu neuropatii indukowanej w różnych mechanizmach uszkodzeń, takich jak: uszkodzenie mechaniczne nerwów (w wyniku ich przerwania, zgniecenia, zmiżdżenia itp.), uszkodzenie metaboliczne (m.in. w wyniku długo utrzymującego się wysokiego poziomu glukozy we krwi, jak polineuropatia cukrzycowa), po przebytych infekcjach wirusowych (polineuropatia wywołana zakażeniem wirusem HIV, *Herpes zoster*), czy po podaniu substancji chemicznych o działaniu neurotoksycznym (CIPN). Każda z tych neuropatii charakteryzuje się odmienną patofizjologią, a tym samym zmienną odpowiedzią terapeutyczną na zastosowane leczenie. Poniżej na Rycinie 3 przedstawione zostały rekomendacje leczenia bólu neuropatycznego wg [152].



Rycina 3. Rekomendacje leczenia bólu neuropatycznego wg [152].

NNT (ang. number needed to treat; wskaźnik używany do porównania skuteczności leków).

1.4.1 Rekomendacje leczenia bólu neuropatycznego wg [152]

1.4.1.1 Leki I rzutu leczenia bólu neuropatycznego

Trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (TLPD) stanowią szeroką grupę leków, spośród których najczęściej stosowana jest amitryptylina. TLPD uznawane są za skuteczne leki i charakteryzują się wielokierunkowym działaniem na liczne cele terapeutyczne [154]. TLPD przede wszystkim wpływają na poziom monoamin. Oprócz tego wykazują również zdolność blokowania kanałów sodowych, dzięki czemu hamują wyładowania ektopowe występujące w przypadku uszkodzenia nerwu i łagodzą ból neuropatyczny [176–178]. Dodatkowo część TLPD wykazuje zdolność blokowania receptorów N-metylo-D-asparaginowych (NMDAR), które są jednym z czynników odpowiedzialnych za powstawanie i utrzymywanie się neuropatii [154,179].

TLPD blokują kanały wapniowe, są aktywatorami kanałów potasowych, antagonizują receptory α_1 -adrenergiczne, modulują układ adenozyiny, poprzez zwiększenie dostępności adenozyiny i miejscowe uwalnianie oraz aktywację receptora adenozyiny A_1 (głównie amitryptylina), zwiększają czynność metabotropowego receptora kwasu γ -aminomasłowego ($GABA_B$), aktywują receptory opioidowe, hamują produkcję tlenku azotu, wpływają na stan zapalny poprzez obniżenie produkcji prostaglandyny E_2 oraz $TNF\alpha$ [154,180]. Szeroki zakres aktywności wpływa na skuteczność w leczeniu bólu neuropatycznego, ale jednocześnie pociąga za sobą przeciwwskazania i efekty niepożądane, które są dość uciążliwe i występują u około 20% pacjentów, prowadząc do zaprzestania kontynuowania terapii [181].

W przypadku CIPN podanie amitryptyliny w niskich dawkach (5 i 10 mg/kg; dozoładowo) u szczurów w schemacie podania wielokrotnego powodowało zniesienie allodynii mechanicznej, ale nie termicznej w neuropatii indukowanej oksaliplatyną [182]. Zastosowanie tych samych dawek u myszy łagodziło również objawy nadwrażliwości termicznej na niską temperaturę (badania własne) [183]. W badaniach klinicznych wykazano, iż podanie doustne amitryptyliny nie łagodzi objawów neuropatii czuciowej, chociaż obserwuje się tendencję do poprawy i redukcji objawów [184]. Podobne efekty zaobserwowano w wyniku podania nortryptyliny [185]. Obecnie amitryptylina stosowana jest w terapii bólu neuropatycznego głównie miejscowo - jako maść z ketaminą [186] i baklofenem [187] albo jako 10% krem podawany dwa razy dziennie w pierwszym rzucie leczenia pacjentów z CIPN, osiągając zadowalające efekty [188,189].

Duloksetyna i wenlafaksyna

Duloksetyna i wenlafaksyna należą do grupy leków przeciwdepresyjnych hamujących wychwyty zwrotny NA i 5-HT. Duloksetyna dodatkowo wykazuje działanie poprzez słabe hamowanie wychwyty zwrotnego DA oraz powinowactwo do receptorów i neuroprzekazników, w tym receptorów adrenergicznych, muskarynowych (nieselektywnie), histaminowych H_1 , dopaminergicznych D_2 , receptorów 5-HT $_{1A}$, 5-HT $_{1D}$ i 5-HT $_{2C}$ oraz receptorów opioidowych [190]. Z kolei wenlafaksyna silniej blokuje wychwyty 5-HT w mniejszych dawkach, NA w wyższych dawkach [191] oraz słabo hamuje wychwyty DA. Nie posiada znaczącego powinowactwa do receptorów [192].

Duloksetyna jest zatwierdzona przez Agencję ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) w leczeniu zaburzeń depresyjnych, uogólnionych zaburzeń lękowych, fibromialgii, przewlekłego bólu mięśniowo-szkieletowego oraz obwodowej polineuropatii

cukrzycowej. Z kolei wykorzystanie poza zakresem wskazań rejestracyjnych, obejmuje łagodzenie objawów CIPN oraz wysiłkowego nietrzymania moczu zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn [193,194].

Zastosowanie duloksetyny w leczeniu różnych typów bólu neuropatycznego jest bardzo szerokie. W przypadku CIPN istnieje liczna grupa badań obejmująca wykorzystanie duloksetyny w łagodzeniu objawów neuropatii obwodowej indukowanej oksaliplatyną i paklitaksellem [195], winkrystyną [196], czy bortezomibem [197] w modelach zwierzęcych. Badania kliniczne również wykazały istotny wpływ wykorzystania tego leku w łagodzeniu objawów CIPN w przypadku neuropatii wywołanej przez oksaliplatynę, paklitaksel, winkrystynę czy bortezomib u ludzi [198–201]. Duloksetyna jest obecnie uważana jako jeden z bezpieczniejszych i skuteczniejszych leków łagodzących objawy CIPN [202,203].

Wenlafaksyna uznawana jest za skuteczny, bezpieczny i dobrze tolerowany lek w leczeniu objawowego bólu neuropatycznego, w tym bólu w CIPN wywołanego terapią bazującą na taksanie i oksaliplatynie [204,205]. W badaniach klinicznych nie potwierdzono ochronnego działania wenlafaksyny w zapobieganiu CIPN indukowanej oksaliplatyną [206].

Leki przeciwpadaczkowe – gabapentyna i pregabalina

Gabapentyna i pregabalina były jednymi z pierwszych leków stosowanych w leczeniu różnych typów bólu neuropatycznego. Oba leki wykazują identyczny mechanizm działania, wiążąc się z podjednostką $\alpha_2\delta$ VGCCs, co prowadzi do zmniejszonego napływu jonów wapnia przez presynaptyczne kanały wapniowe oraz zahamowania uwalniania neuroprzekaźników takich jak: glutaminian, NA, kwas γ -aminomasłowy (GABA), substancja P, peptyd związany z genem kalcytoniny (ang. *calcitonin gene-related peptide*, CGRP), acetylocholina oraz glicyna [207].

Terapia gabapentyną ze względu na wysoką dawkę niezbędną do uzyskania efektu terapeutycznego (około 1800 mg/dzień, a u niektórych pacjentów nawet 3600 mg/dzień), wiązała się z występowaniem działań niepożądanych oraz brakiem tolerancji przez niektórych pacjentów tak wysokich dawek tego leku [208].

Pregabalina jest nowszym analogiem GABA, zarejestrowanym w leczeniu obwodowego i ośrodkowego bólu neuropatycznego u dorosłych. Dawkowanie leku wynosi do 300-600 mg/dzień w dwóch lub trzech dawkach podzielonych, rozpoczynając leczenie od dawki 150 mg dziennie. Pregabalina jest lekiem dobrze tolerowanym, który może zapewnić dobry poziom uśmierzenia różnych typów bólu neuropatycznego [209]. W przypadku CIPN pregabalina hamuje neuropatię czuciową u chorych otrzymujących oksaliplatynę i paklitaksel, w tym również dzieci leczonych onkologicznie [210]. W przeciwieństwie do gabapentyny, pregabalina jest również wskazana w leczeniu innych zaburzeń bólowych, jak fibromialgii, polineuropatii cukrzycowej i po przebytych półpaścu [210] oraz zaburzeń łękowych [211].

W ostatnich latach wzrosła liczba doniesień o możliwym nadużywaniu gabapentynoidów [212,213]. Czynnikiem odpowiedzialnym za nadużywanie tych leków jest prawdopodobnie działanie euforyczne, jakie wywołują u niektórych pacjentów. Dodatkowo szybka tolerancja rozwijająca się po stosowaniu w celu osiągnięcia pożądanego przez pacjenta działania pobudzającego, prowadzi często do epizodów przedawkowania [211,214].

1.4.1.2 Leki II rzutu leczenia bólu neuropatycznego

Plastry z lidokainą (5%)

Lidokaina stosowana miejscowo wykazuje działanie przeciwbólowe poprzez blokadę kanałów sodowych, zlokalizowanych w małych niezmielinizowanych włóknach nerwowych (włóknach C) i małych zmienilizowanych włóknach $A\delta$, co prowadzi do zmniejszenia wyładowań ektopowych, podnosi próg takich wyładowań i hamuje przewodzenie bólu [215,216].

Plastry z lidokainą stanowią ciekawą alternatywę leczenia bólu neuropatycznego dla leków stosowanych ogólnoustrojowo. Są one głównie zalecane w celu miejscowego leczenia bólu neuropatycznego, jak nerwoból popółpaścowy [216]. Stosowanie plastrów redukuje poważne działania niepożądane, które często towarzyszą lekom podawanym ogólnoustrojowo. Ponadto w ramach takiej terapii nie ma potrzeby modyfikacji dawki innych stosowanych leków. Jest to szczególnie ważne w przypadku pacjentów geriatrycznych, u których z uwagi na częstą polipragmazję nie zaleca się przyjmowania kolejnego preparatu drogą doustną [217].

Przeprowadzone zostały również badania skuteczności dożylnego podania lidokainy. W tym przypadku objawy ustępują szybko, a efekty utrzymują się nawet do dwóch tygodni. Jednak dotychczasowe badania kliniczne zostały przeprowadzone na bardzo małej grupie pacjentów, niewystarczającej do szerszej oceny skuteczności leku podawanego dożylnie [218,219].

Plastry o wysokim stężeniu kapsaicyny (8%)

Kapsaicyna jest selektywnym agonistą TRPV1 i indukuje aktywację nocyceptorów skórnych z ekspresją TRPV1. Po aktywacji kanał TRPV1 otwiera się przejściowo, powodując napływ jonów (sodowych i wapniowych), a następnie uwalnianie wazoaktywnych neuropeptydów, depolaryzację i propagację potencjałów czynnościowych do rdzenia kręgowego i mózgu [220]. Do tej pory udowodniono, iż taka forma podania kapsaicyny, w postaci plastrów z kapsaicyną w wysokim stężeniu jest skuteczna w leczeniu neuralgii popółpaścowej, neuropatii związanej z bólem wywołanym przez wirus HIV oraz CIPN wywołanej oksaliplatyną [221,222].

Plaster przeznaczony do leczenia bólu neuropatycznego zawiera kapsaicynę w stężeniu 8%. W takiej postaci kapsaicyna może być stosowana wyłącznie w ściśle kontrolowanych warunkach, z zastosowaniem leków miejscowo znieczulających ze względu na bardzo intensywne doznania bólowe pojawiające się na początku leczenia. Korzyści terapeutyczne po zastosowanej terapii utrzymują się przez około 12 tygodni, po których można rozważyć powtórzenie aplikacji [222].

Tramadol

Tramadol jest substancją zaliczaną do słabych opioidowych leków przeciwbólowych o dodatkowym mechanizmie działania, który obejmuje aktywację receptorów μ -opiodowych, prawdopodobnie hamowanie receptorów muskarynowych M_1 i M_3 , oraz otwieranie kanałów potasowych. W przeciwieństwie do klasycznych leków opioidowych, tramadol wpływa głównie na układ monoaminoergiczny poprzez hamowanie wychwyty zwrotnego NA i 5-HT w zstępujących drogach hamowania bólu [223].

W celu łagodzenia objawów CIPN stosowano różne połączenia tramadolu, m.in. z dekstrometorfanem w modelu winkrystynowym [224] czy jako pojedynczy preparat w modelu oksaliplatynowym [225], wykazując interesujący profil działania przeciwbólowego, łagodzący objawy CIPN w badaniach na zwierzętach [226]. Badania kliniczne dotyczące podania łączonego tramadolu z acetaminofenem wykazały brak istotnej statystycznie skuteczności w leczeniu CIPN [227]. Ciekawą opcją może okazać się wykorzystanie aktywnego metabolitu tramadolu – desmetramadolu, który charakteryzuje niższe ryzyko interakcji i taka sama skuteczność leczenia bólu oraz bezpieczeństwo terapii jak w przypadku tramadolu [228].

Tramadol wydaje się bezpieczniejszym lekiem niż klasyczne leki opioidowe pod względem ryzyka nadużywania i przedawkowania [229]. Obecnie tramadol klasyfikowany jest jako druga linia leczenia CIPN, przy czym ustalona drabina analgetyczna leczenia CIPN pochodzi z 2015 roku, a od tego czasu znacznie więcej wiadomo o skuteczności poszczególnych leków w leczeniu CIPN [12,230].

1.4.1.3 Leki III rzutu leczenia bólu neuropatycznego

Silne leki opioidowe (morfina, oksykodon, metadon)

Morfina i oksykodon są dobrze znanymi lekami opioidowymi, agonistami receptorów opioidowych (μ , κ , δ). Metadon, z kolei, jest silnym agonistą receptorów μ oraz antagonistą NMDAR [231,232]. Porównując różne badania oceniające skuteczność opioidowych leków przeciwbólowych w leczeniu CIPN można wyciągnąć wniosek, iż niektóre leki opioidowe zapewniają znaczną, ale krótkotrwałą ulgę [233]. Ze względu na profil działania, dyskusyjną skuteczność, generowanie poważnych działań niepożądanych, w tym działania uzależniającego, wykorzystanie ich w leczeniu bólu neuropatycznego jest niejednoznaczne i obarczone potrzebą ścisłej kontroli lekarskiej [234].

Ciekawą opcją leczenia CIPN może okazać się tapentadol, który charakteryzuje unikalny, dualny mechanizmem działania jako agonista receptorów opioidowych μ , jednocześnie hamujący wychwyt zwrotny NA. Lek ten okazał się skuteczny w różnych modelach bólu neuropatycznego, w tym w modelu CIPN [235]. Badanie kliniczne wśród pacjentów cierpiących na CIPN wykazało jego dobrą tolerancję i wysoką skuteczność. Było to jednak badanie przeprowadzone na niewielkiej grupie pacjentów (31) i w celu rekomendacji zastosowania tapentadolu niezbędne są dodatkowe testy [236].

Innym rozwiązaniem w leczeniu bólu neuropatycznego, w tym CIPN mogą być nowe leki opioidowe jak cebranopadol [237], czy związek SRI-22141 [238], których skuteczność w łagodzeniu objawów bólowych, w tym różnego typu neuropatii jest oceniana m.in. w badaniach klinicznych.

1.4.1.3.1 Neurotoksyny – Toksyna botulinowa typ A

Mechanizm działania przeciwbólowego toksyny botulinowej typu A polega prawdopodobnie na: hamowaniu uwalniania mediatorów bólu (substancji P, glutamianu i CGRP) z zakończeń nerwowych i DRG, oddziaływaniu na szlak TRPV1, zmniejszaniu zapalenia wokół zakończeń nerwowych oraz dezaktywacji kanałów sodowych [239,240]. Istnieją dane sugerujące udział neuronów i komórek glejowych w procesie analgezji wywołanej przez toksynę botulinową typu A, jak również potwierdzono zmniejszenie fosforylacji NF- κ B, kinazy aktywowanej

mitogenami p38, kinazy białkowej regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. *extracellular signal-regulated kinases*, ERK1/2) w mikrogleju oraz bezpośrednią interakcją z receptorem toll-podobnym typu 2 [241].

W badaniach klinicznych podanie toksyny botulinowej A w sposób istotny indukowało łagodzenie objawów i intensywności bólu. Terapia ta była bezpieczna i dobrze tolerowana. Dodatkowo kolejna dawka toksyny nie zaburzała czucia, jednocześnie wykazując zwiększoną skuteczność w łagodzeniu objawów bólowych również wśród pacjentów, u których pierwsze podanie przyniosło niewielki efekt terapeutyczny [242].

1.5 POSZUKIWANIE NOWYCH ZWIĄZKÓW W LECZENIU I PROFILAKTYCE BÓLU NEUROPATYCZNEGO

W terapii bólu neuropatycznego w przebiegu CIPN na chwilę obecną brak jest skutecznego leczenia w pełni łagodzącego objawy bólowe. Proces poszukiwania, syntezy i oceny działania terapeutycznego nowych związków jest zadaniem czasochłonnym, kosztownym i często długotrwałym. Jednak ze względu na ograniczone możliwości stosowania dostępnych na rynku farmaceutycznym leków, ich niewystarczającą skuteczność i działania niepożądane istnieje ciągła potrzeba poszukiwania i syntezy nowych skutecznych leków łagodzących objawy bólu neuropatycznego.

Innym podejściem poszukiwania skutecznej terapii CIPN jest wykorzystanie dostępnych na rynku farmaceutycznym leków poza zakresem ich wskazań rejestracyjnych. W oparciu o mechanizm działania i udokumentowaną aktywność bada się dostępne leki i preparaty pod kątem wykorzystania w łagodzeniu objawów bólowych wywołanych przez CIPN.

Badania skupiają się również na znalezieniu skutecznej profilaktyki uszkodzeń CIPN. Prace trwające w różnych laboratoriach dają nadzieję na wypracowanie pewnego konsensusu, co do przyszłych strategii zredukowania szybkości rozwoju oraz intensywności CIPN [243]. Stosowanie profilaktyki CIPN jest ograniczone przez możliwe interakcje takiej terapii z leczeniem onkologicznym, co może nasilać działania niepożądane i prowadzić do zaprzestania kontynuacji terapii albo konieczności zredukowania dawki stosowanego leku przeciwnowotworowego [244]. Spośród około 40 randomizowanych badań klinicznych skupiających się na poszukiwaniu skutecznej terapii profilaktycznej z wykorzystaniem różnych leków i związków o potencjalnym działaniu ochronnym w rozwoju CIPN, tylko duloksetyna wykazała umiarkowaną skuteczność [244,245]. Pozostałe przebadane dotąd substancje (jak: acetylo-L-karnityna, amifostyna, amitryptylina, Ca/Mg dla pacjentów otrzymujących chemioterapię na bazie oksaliplatyny, glutation dla pacjentów otrzymujących chemioterapię paklitakselem/karboplatiną, nimodypina, Org 2766 (heksapeptydowy analog ACTH), kwas all-trans-retinowy, witamina E i B, kalmangafodipir, kannabinoidy, karbamazepina L-karnozyna, dietyloditiokarbaminian, gabapentyna/pregabalina, glutaminian, goshajinkigan (GJG), metformina, minocyklina, N-acetylocysteina, kwasy tłuszczowe, omega-3, okskarbazepina, rekombinowany ludzki czynnik hamujący białaczkę, wenlafaksyna [245,246]) okazały się nieskuteczne.

Brak rekomendacji i potwierdzonej skuteczności terapii wynika często z faktu, iż badania kliniczne prowadzone są na niezbyt licznej grupie osób. Co więcej, niespójne

subiektywne i obiektywne pomiary wyników, wybór grupy kontrolnej oraz różny czas trwania badań dodatkowo utrudnia i ogranicza wyciągnięcie klarownych wniosków [246]. Dlatego też, w obecnych zaleceniach dotyczących profilaktyki CIPN powiela się stanowisko, iż większość z przebadanych i proponowanych terapii prewencyjnych, nie jest ogólnie rekomendowana w celu zapobiegania wystąpieniu CIPN u pacjentów przyjmujących różne leki onkologiczne.

Duloksetyna

Duloksetyna okazuje się jedynym lekiem, który jest obecnie dopuszczony i rekomendowany w profilaktyce CIPN przez Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej (ang. *American Society of Clinical Oncology*, ASCO) [245,246]. Mechanizm działania przeciwbólowego obejmuje głównie wpływ na wychwyt zwrotny 5-HT i NA oraz hamowanie VGSCs [244]. W badaniach klinicznych podanie duloksetyny wykazuje wyższą skuteczność łagodzenia objawów bólowych i niższy potencjał indukowania działań ubocznych niż w przypadku wenlafaksyny [198,247]. Obecnie trwa próba kliniczna fazy II i III oceniająca skuteczność profilaktyczną duloksetyny w modelu CIPN indukowanej oksaliplatyną, której koniec przewidziany jest na grudzień 2026 roku (próba kliniczna nr: NCT04137107).

Kalmangafodipir

Jest to pochodna mangafodipiru, związku celującego w MnSOD, który okazuje się mieć obiecującą skuteczność jako prewencja CIPN wywołanej oksaliplatyną. Kalmangafodipir jest związkiem działającym poprzez degradację i redukcję ilości RFT w celu przywrócenia homeostazy tlenowej w organizmie [23]. Taki mechanizm działania profilaktycznego może okazać się korzystny, biorąc pod uwagę obserwowane w CIPN zaburzenia funkcjonowania mitochondriów w peryferyjnych neuronach czuciowych, ich wakuolizację i zwiększenie poziomu MnSOD obserwowane po leczeniu przeciwnowotworowym [248].

Na chwilę obecną kalmangafodipir nie jest zalecany jako profilaktyka CIPN. Badania kliniczne III fazy z jego udziałem jako preparat PledOx, w prewencji neuropatii obwodowej indukowanej oksaliplatyną, zostały przerwane ze względu na silne reakcje alergiczne obserwowane po wielokrotnym podaniu [249].

Dazatynib

Dazatynib jest podawanym doustnie inhibitorem wielu kinaz tyrozynowych, w tym kinazy z rodziny BCR-ABL i SRC oraz inhibitorem transportera kationów organicznych (ang. *organic cation transporter 2*, OCT2) strukturalnie niezwiązanego z imatynibem [244,250]. W badaniach przedklinicznych wykazano, że wychwyt leków przeciwnowotworowych przez transportery do DRG jest zjawiskiem, które zapoczątkowuje uszkodzenie neuronów czuciowych podczas terapii onkologicznej. Natomiast genetyczne lub farmakologiczne zablokowanie tych transporterów chroni przed rozwojem CIPN związanej z podaniem takich leków jak: paklitaksel, winkrystyna i oksaliplatyna [244]. Zastosowanie celowanych inhibitorów tych transporterów może być skuteczną terapią neuroprotekcijną, bez wpływu na ogólnoustrojowy klirens leku oraz efektywność terapii przeciwnowotworowej [244]. Wykorzystanie takiego podejścia prewencyjnego jest testowane podczas fazy Ib (próba kliniczna nr: NCT04164069) w modelu neuropatii indukowanej oksaliplatyną [251].

W badaniach na zwierzętach podanie dazatynibu chroniło przed wystąpieniem neuropatii obwodowej wywołanej oksaliplatyną. Dodatkowo zaobserwowano zmniejszoną akumulację oksaliplatyny w DRG bez negatywnego wpływu na skuteczność terapii onkologicznej [252,253]. Wydaje się, że dazatynib może być interesującą i skuteczną opcją profilaktyki CIPN, jednak na wysunięcie konkretnych wniosków należy poczekać do zakończenia badań klinicznych.

Nilotynib

Zahamowanie białek transportujących aniony organiczne (ang. *organic anion-transporting polypeptide 1B*, OATP1B) może wykazać efekt neuroprotekcyny w przypadku chemioterapii opartej na paklitakselu [254]. Taki mechanizm działania wykazuje nilotynib, który jest inhibitorem kinazy BCR-ABL, zatwierdzonym do leczenia pacjentów z nowo rozpoznaną przewlekłą białaczką szpikową z chromosomem Philadelphia (Ph+) [255]. W modelu zwierzęcym wykazano, iż genetyczny i farmakologiczny nokaut transporterów OATP1B chroni zwierzęta przed allodynią indukowaną mechanicznie i nadwrażliwością termiczną. Dodatkowo badania potwierdziły brak negatywnego wpływu nilotynibu na terapię przeciwnowotworową paklitakselem, jak również działanie synergistyczne takiego połączenia leków [256].

Obecnie nilotynib jako profilaktyka CIPN indukowanej paklitakselem znajduje się w fazie Ib/II badań klinicznych, której zakończenie prognozowano na grudzień 2021 roku (próba kliniczna nr: NCT04205903), jednak na chwilę obecną brak jest dostępnych wyników badania [257].

Riluzol

Riluzol jest lekiem neuroprotekcynowym, zatwierdzonym przez FDA jako bezpieczny i dobrze tolerowany preparat dla pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym. Mechanizm działania leku polega na blokowaniu patologicznego napływu jonów sodowych i hamowaniu nieprawidłowej transmisji glutaminianergicznej w OUN oraz aktywacji kanałów potasowych TREK-1 i TRAAK [258]. W modelu zwierzęcym podanie riluzolu zapobiegało wystąpieniu deficytów czuciowych i motorycznych związanych z podaniem oksaliplatyny. Efekt terapeutyczno-ochronny w modelu CIPN indukowanej oksaliplatyną przypisuje się działaniu riluzolu na kanał TREK-1, który prawdopodobnie odgrywa ważną rolę w procesie percepcji bólu. Jednocześnie taka terapia nie wykazywała negatywnego wpływu na działanie przeciwnowotworowe oksaliplatyny [49,259].

W badaniach klinicznych riluzol jako profilaktyka CIPN znajduje się w II fazie badań klinicznych u osób z rakiem jelita grubego otrzymujących jako terapię przeciwnowotworową oksaliplatynę (próba kliniczna nr: NCT03722680).

Kwas gangliozydowo-monosialowy (GM1)

GM1 zaliczany jest do pochodnych glikosfingolipidu, który występuje w zewnętrznej warstwie błony komórkowej jako jedna z kluczowych substancji dla rozwoju nerwów, ich różnicowania i naprawy po urazach oraz jako modulator różnych funkcji mózgu ze względu na regulację plastyczności neuronów, uwalnianie neurotrofin, neurotransmisję i interakcję z białkami neuroregulacyjnymi [244,260]. Proponowane mechanizmy działania neuroprotekcynowego obejmują wpływ na regenerację nerwów, usuwanie RFT oraz hamowanie peroksydacji lipidów [244]. Działanie profilaktyczne GM1 w neuropatii indukowanej paklitakselem zostało udowodnione i potwierdzone w modelu zwierzęcym CIPN [261]. U ludzi GM1 istotnie hamował neurotoksyczność u pacjentów leczonych oksaliplatyną [262]. Skuteczność prewencyjnego działania GM1 w neuropatii obwodowej indukowanej taksanem, prowadziło do zmniejszenia ciężkości i częstości CIPN [263].

Kanabidiol

Kanabidiol jest niezależniającym i pozbawionym efektu euforycznego związkem pozyskanym z konopi indyjskich, o zróżnicowanym zakresie wskazań terapeutycznych obejmującym przewlekły ból, nudności, padaczkę, psychozy i lęk [264]. Mechanizm działania nie jest do końca poznany. Kanabidiol w przeciwieństwie do $\Delta 9$ -tetrahydrokanabinolu (THC) wykazuje niskie powinowactwo do receptora CB₁ oraz jest allosterycznym agonistą receptora serotoninowego 5-HT_{1A}. Oddziałuje z kanałem TRPV1 oraz szlakiem sygnałowym mTOR, hamuje neurotoksyczność glutaminianu, wykazuje aktywność przeciwutleniającą oraz jest w stanie hamować TNF- α [264–266]. Kanabidiol, ze względu na swój mechanizm działania i profil terapeutyczny jest jednym z głównych kanabinoidów przebadanych pod kątem skuteczności leczenia CIPN [267]. W modelach zwierzęcych CIPN osłabiał allodynię mechaniczną indukowaną podaniem paklitakselu, oksaliplatyny, ale nie winkrystyny, wykazując również synergistyczny efekt z jednocześnie podawanym THC [268].

U ludzi kanabidiol obecnie poddawany jest badaniom klinicznym II fazy jako profilaktyka CIPN indukowanej oksaliplatyną. Koniec badania planowany jest na sierpień 2023 roku (próba kliniczna nr: NCT04582591) [269].

Lidokaina

Aktywność lidokainy w postaci podania dożylnego jest kolejną z metod profilaktycznych ocenianych w badaniach klinicznych. W modelu bolesnej obwodowej neuropatii indukowanej oksaliplatyną podanie dożylnie lidokainy ma na celu ocenić zarówno tolerancję i skuteczność tego leku w zapobieganiu wystąpienia nadwrażliwości na zimno oraz epizodów bólu spontanicznego (próba kliniczna nr: NCT03254394) [270].

2 HIPOTEZA I CELE BADAWCZE

2.1 CELE PRACY

Z uwagi na lekooporność bólu neuropatycznego, wysoki odsetek chorych leczonych onkologicznie, u których rozwija się CIPN, brak skutecznych analgetyków łagodzących objawy CIPN, takie jak allodynia i hiperalgezia wywołane bodźcami mechanicznymi i termicznymi, głównym celem badań było zbadanie wpływu wybranych leków i ich połączeń na próg pobudliwości bólowej u myszy. Do badań wykorzystano model CIPN indukowanej oksaliplatyną. Cele szczegółowe obejmowały sprawdzenie czy leki działające poprzez następujące mechanizmy leżące u podłoża CIPN jak:

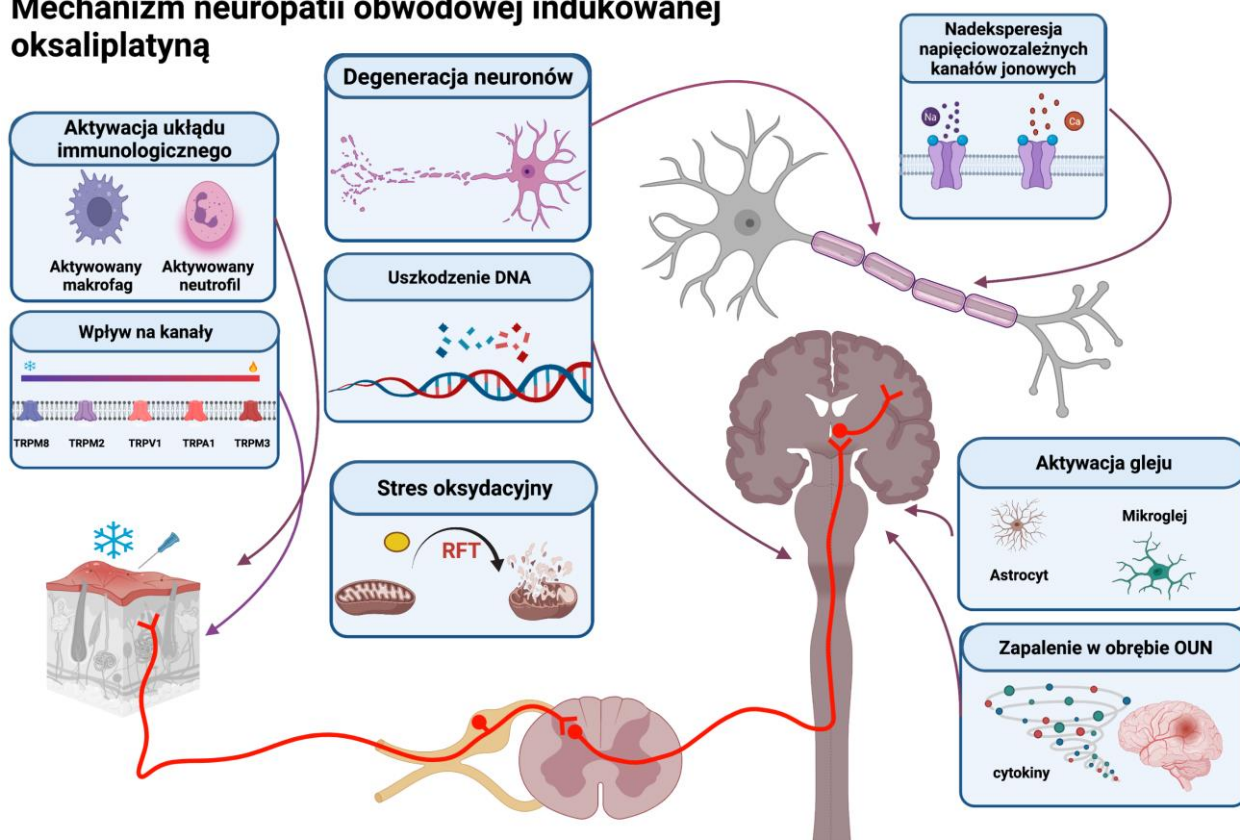
- ✓ zaburzona równowaga między układami torowania i hamowania bólu (morfina, cebranopadol [271,272]),
- ✓ nadekspresja kanałów sodowych (ambroksol [273], lakoamid [274]) i wapniowych (pregabalina [275]),
- ✓ mechanizmy wolnorodnikowe i zapalne (simwastatyna [276]),
- ✓ zaburzenia przekąźnictwa serotonergicznego (NLX-112 [277]), serotonergicznego i noradrenergicznego (amitryptylina [278], duloksetyna [195]), glutaminianergicznego (ceftriaxon [279]), serotonergicznego i dopaminergicznego (aripirazol [280]),
- ✓ neurozapalenie, aktywacja mikrogleju (minocyklina [281]),

mogą być potencjalnie skutecznymi analgetykami stosowanym w celu łagodzenia bólu neuropatycznego w przebiegu CIPN. Ponadto, z uwagi na brak dostępnych danych dotyczących stosowania terapii skojarzonej (ang. *Combination drug therapy*, CDT) bólu w przebiegu CIPN, dla wybranych połączeń leków zbadano dodatkowo, czy CDT może być skutecznym podejściem w leczeniu złożonych objawów bólowych CIPN indukowanej oksaliplatyną z uwagi na szeroki zakres uszkodzeń występujących podczas terapii tym cytostatykiem (Rycina 4).

W niniejszej pracy skupiono się na lekach już zarejestrowanych do leczenia innych niż ból neuropatyczny schorzeń, wykorzystując repozycjonowanie tych leków (ang. *drug repurposing*) jako metodę alternatywną dla czasochłonnego i kosztownego procesu poszukiwania nowych związków chemicznych (ang. *drug discovery & development*) w kierunku analgetyków przeznaczonych do leczenia bólu w przebiegu CIPN. Zaletą wykorzystania leków powszechnie dostępnych jest z pewnością to, że leki te są dobrze poznane w kontekście ich działania farmakologicznego, w tym działań niepożądanych, a sam proces ewentualnego wprowadzenia ich do terapii bólu neuropatycznego byłby zdecydowanie skrócony w porównaniu z wprowadzeniem na rynek farmaceutyczny nowo zaprojektowanych cząsteczek chemicznych.

Badane leki i substancje znajdujące się w zaawansowanych fazach badań klinicznych (jak cebranopadol i befiradol) podano w kilku schematach (opisanych w podrozdziale 3.3), jednak zasadniczo skoncentrowano się na podaniu tych leków zwierzętom z zaindukowaną neuropatią (schemat leczniczy – Rozdział 3.3.1.1, 3.3.1.2 oraz 3.3.1.5) lub przed indukcją neuropatii (schemat profilaktyki – Rozdział 3.3.1.3 i 3.3.1.4).

Mechanizm neuropatii obwodowej indukowanej oksaliplatyną



Rycina 4. Mechanizmy zaangażowane w rozwój CIPN indukowanej oksaliplatyną.

Ostatni etap badań dotyczył opracowania metody analizy preferencji termicznych myszy w modelu CIPN indukowanej oksaliplatyną. W tej części badań wykorzystano dwa leki uznawane powszechnie za modelowe i referencyjne w badaniach dotyczących leków przeciwbólowych do leczenia bólu w przebiegu CIPN, tj. pregabalinę i duloksetynę. W celu przeprowadzenia tego etapu badań wykorzystano skonstruowany przez naukowców z Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie i Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie analgezometr, który mierzył preferencje termiczne zwierząt z neuropatią w szerokim zakresie temperatur. Badania przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej były realizowane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki pt. „Opracowanie metody optymalizacji dawkowania leków przeciwbólowych stosowanych jako terapia skojarzona bólu neuropatycznego z wykorzystaniem metod sztucznej inteligencji” (numer: UMO-2015/17/B/NZ7/02937, kierownik projektu: prof. dr hab. Kinga Sałat).

3 MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

3.1 ZWIERZĘTA WYKORZYSTANE W DOŚWIADCZENIACH

W badaniach eksperymentalnych wykorzystano samce myszy domowej (*Mus musculus*) szczepu CD-1 Swiss Albino, w wieku 4–6 tygodni i masie ciała 18–22 g. Wszystkie wykonane eksperymenty i procedury badawcze zostały przeprowadzone za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (4/2016) oraz I Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (245/2019). Warunki bytowe utrzymywania zwierząt były zgodne z zasadami deklarowanej zgodności warunków bytowania i przeprowadzania doświadczeń na zwierzętach opisanym w traktacie UE nr 123 (*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes ETS No.: 123*) oraz wytycznymi zawartymi w rozporządzeniu Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14.12.2016 r. W trakcie trwania eksperymentów zwierzęta przebywały w standardowych klatkach bytowych (o wymiarach 420 mm x 265 mm x 180 mm, 825 cm³) wypełnionych standardową ściółką odpowiednią dla warunków bytowych gatunku myszy domowej oraz nieograniczonym dostępem do wody i pokarmu. Zwierzęta przebywały w temperaturze pokojowej (22±2 °C) i poziomie wilgotności 55±10%. Podczas eksperymentów utrzymywano stałą temperaturę i wilgotność w pomieszczeniach. Zwierzęta były utrzymywane w cyklu światło:ciemność (12:12). Dodatkowo w klatkach, w których przebywały zapewniono wzbogacenie środowiska (drewniane klocki, tunele, domki do schronienia).

3.2 BADANE ZWIĄZKI

W ramach eksperymentów wykorzystano i przebadano następujące leki:

1. Oksaliplatyna (Sigma-Aldrich, Niemcy) podawana dootrzewnowo (*i.p.*) w roztworze 5% glukozy (Polfa Kutno, Polska) w dawce 10 mg/kg. Dawkę wybrano na podstawie danych literaturowych aktywności tego związku stosowanego w celu indukcji neuropatii obwodowej u myszy [103].
2. Cebranopadol (MedChem Express, USA) podawany podskórnice (*s.c.*) rozpuszczony w roztworze 100% DMSO (Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska) i soli fizjologicznej (1:1) w dawce 10 mg/kg. Zastosowaną dawkę wyznaczono eksperymentalnie w warunkach laboratoryjnych.
3. Befiradol/NLX-112 (Neurolix Inc., USA) podawany dootrzewnowo (*i.p.*) w roztworze soli fizjologicznej w dawkach 1.25 mg/kg, 2.5 mg/kg oraz 5 mg/kg. Zastosowane dawki wyznaczono eksperymentalnie w warunkach laboratoryjnych.
4. Chlorowodorek morfiny (Polfa Kutno, Polska) podawany podskórnice (*s.c.*) w roztworze soli fizjologicznej w dawce 10 mg/kg. Dawkę wybrano na podstawie wcześniejszego badania pilotażowego, które wykazało, że pełną skuteczność przeciwnocyceptywną morfiny stosowanej jako lek referencyjny obserwowano przy dawkach 6–10 mg/kg.
5. Simwastatyna (Sigma-Aldrich, Niemcy) podawana dożołądkowo (*p.o.*) w roztworze soli fizjologicznej w dawce 100 mg/kg. Dawkę wybrano na podstawie doniesień literaturowych o aktywności tego leku w testach behawioralnych u myszy [282].

6. Chlorowodorek ambroksolu (PharmaSwiss/Valeant, Polska) podawany dożylnie (*i.v.*) w roztworze soli fizjologicznej w dawkach 37.5 mg/kg oraz 12.5 mg/kg, następnie w celu dostosowania dawki do podania dootrzewnowego (*i.p.*): 90 mg/kg oraz 150 mg/kg. Zastosowane dawki wyznaczono eksperymentalnie w warunkach laboratoryjnych.
7. Chlorowodorek pregabaliny (Tocris Bioscience, Niemcy) podawany dootrzewnowo (*i.p.*) w roztworze zawiesiny 1% Tween 80 (Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska) w dawkach 10 mg/kg oraz 30 mg/kg. Dawki wybrano na podstawie doświadczenia eksperymentatorów i wcześniejszych badań aktywności tego leku w testach behawioralnych u myszy w modelu CIPN [283].
8. Chlorowodorek amitryptyliny (Sigma-Aldrich, Polska) podawany dootrzewnowo (*i.p.*) w roztworze soli fizjologicznej w dawkach 1 mg/kg, 2.5 mg/kg i 10 mg/kg. Dawki wybrano na podstawie danych literaturowych aktywności tego leku w testach behawioralnych u myszy w modelu CIPN [284].
9. Aripiprazol (Abilify 1 mg/ml, Otsuka, Japonia) podawany dootrzewnowo (*i.p.*) w roztworze soli fizjologicznej w dawkach 1 mg/kg oraz 10 mg/kg. Zastosowane dawki wyznaczono eksperymentalnie w warunkach laboratoryjnych na podstawie danych literaturowych aktywności tego leku w testach behawioralnych u myszy [285].
10. Ceftriakson sodowy (Biotraxon, Polpharma S.A., Polska) podawany dootrzewnowo (*i.p.*) w roztworze soli fizjologicznej w dawkach 50 mg/kg oraz 200 mg/kg. Zastosowane dawki wyznaczono eksperymentalnie w warunkach laboratoryjnych w oparciu o dane literaturowe aktywności tego leku w testach behawioralnych u myszy [286].
11. Bromheksyna (F1 Pharma, Polska) podawana dootrzewnowo (*i.p.*) w roztworze zawiesiny 1% Tween 80 (Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska) w dawkach 90 mg/kg oraz 150 mg/kg. Zastosowane dawki wyznaczono eksperymentalnie w warunkach laboratoryjnych.
12. Chlorowodorek duloksetyny (Adamed, Polska) podawano dootrzewnowo (*i.p.*) w roztworze soli fizjologicznej w dawkach 10 mg/kg oraz 30 mg/kg. Dawki wybrano na podstawie doniesień literaturowych aktywności tego leku w testach behawioralnych u myszy [287].
13. Chlorowodorek minocykliny (Sigma-Aldrich, Polska) podawany dootrzewnowo (*i.p.*) w roztworze zawiesiny 1% Tween 80 (Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska) w dawkach 50 mg/kg oraz 100 mg/kg. Zastosowane dawki wyznaczono eksperymentalnie w warunkach laboratoryjnych w oparciu o dane literaturowe aktywności tego leku w testach behawioralnych u myszy [288].
14. Lakoamid (Vimpat, UCB Pharma S.A., Belgia) podawany dootrzewnowo (*i.p.*) w roztworze soli fizjologicznej w dawkach 10 mg/kg oraz 30 mg/kg. Zastosowane dawki wyznaczono eksperymentalnie w warunkach laboratoryjnych w oparciu o dane literaturowe aktywności tego leku w testach behawioralnych u zwierząt [289,290].

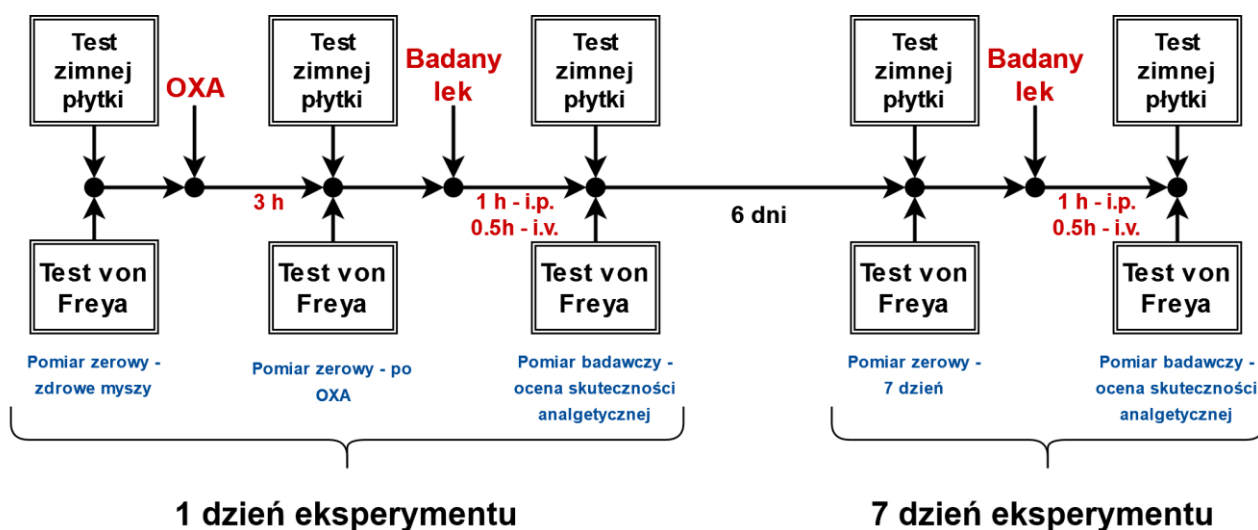
3.3 BADANIA BEHAWIORALNE

3.3.1 Schematy badawcze

3.3.1.1 Podstawowe podanie substancji leczniczych

Eksperyment rozpoczynał się od wykonania wstępnego pomiaru oceniającego wrażliwość termiczną i mechaniczną gryzoni, odpowiednio w teście zimnej płytki i teście von Freya. Następnie zwierzęta otrzymywały dootrzewnowo roztwór oksaliplatyny w celu indukcji modelu CIPN. Po 3 h od podania cytostatyka wykonywano pomiar oceniający rozwój nadwrażliwości termicznej i mechanicznej w pierwszym dniu eksperymentu. Kolejnym krokiem było podanie wcześniej przygotowanych *ex tempore* roztworów substancji badanych przeznaczonych do oceny skuteczności analgetycznej w modelu CIPN. W zależności od drogi podania pomiar po związku wykonywany był po 30 minutach (w przypadku dożylnego podania ambroksolu), 60 minutach (w przypadku podania dootrzewnowego, np. bromheksyna, amitryptylina, ceftriakson) lub 2 h (w przypadku podania dożołądkowego simwastatyny). Aktywność analgetyczną oceniano w teście zimnej płytki oraz teście von Freya.

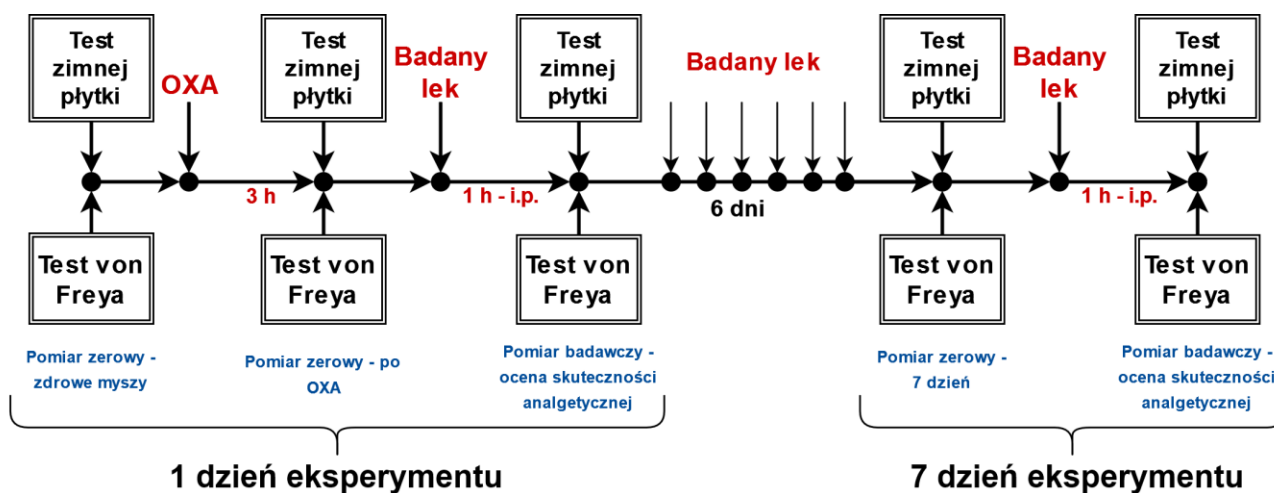
Przez następne 6 dni zwierzęta nie otrzymywały żadnego związku. Po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny pomiary rozpoczynano od wykonania pomiaru zerowego oceniającego rozwój nadwrażliwości mechanicznej i termicznej w siódmym dniu eksperymentu, następnie zwierzęta otrzymywały roztwór badanej substancji i po upływie analogicznego czasu, jak podczas pierwszego dnia, wykonywano pomiar oceniający skuteczność zastosowanego leczenia w siódmym dniu eksperymentu (Rycina 5).



Rycina 5. Schemat podstawowego podania leków i związków.

3.3.1.2 Podanie wielokrotne

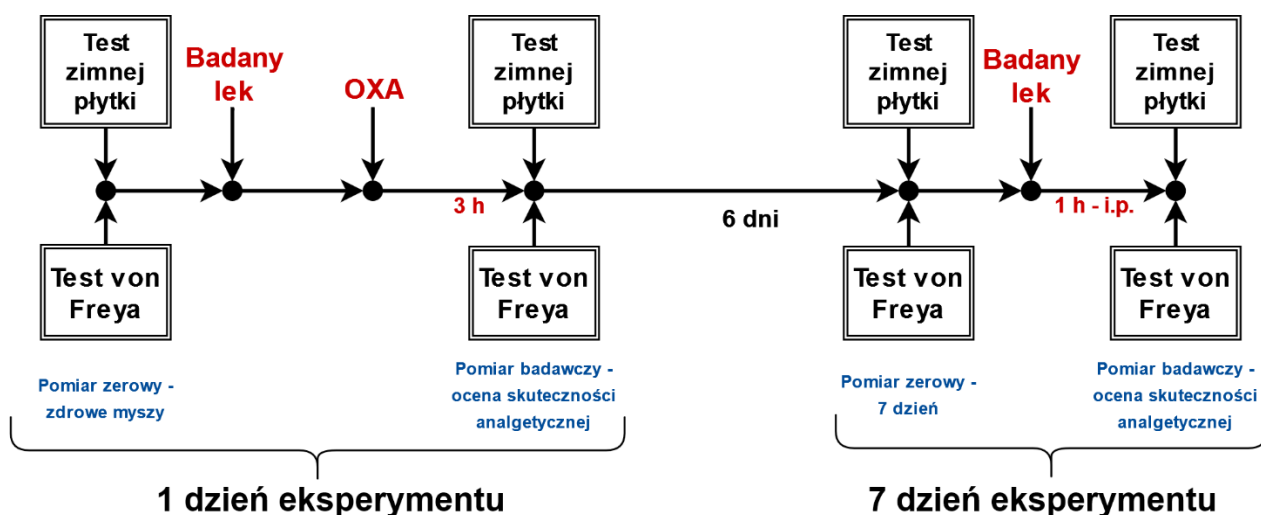
W przypadku podania wielokrotnego pierwszy dzień eksperymentu wyglądał analogicznie, jak w przypadku podania podstawowego. Następnie, rozpoczynając od drugiego dnia, zwierzęta otrzymywały codziennie przez okres 6 dni roztwór badanej substancji bez wykonywania pomiarów zarówno przed, jak i po podaniu związku (oprócz pomiarów wykonanych dla czternastodniowego podania simwastatyny). Po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny wykonywano pomiar zerowy w teście zimnej płytki i teście von Freya. Po wykonaniu pomiaru wstępnego, podawano roztwór badanej substancji i oceniano aktywność przeciwbólową w łagodzeniu objawów nadwrażliwości mechanicznej i termicznej w siódmym dniu eksperymentu (Rycina 6).



Rycina 6. Schemat podania wielokrotnego.

3.3.1.3 Schemat podania profilaktycznego – podanie jednorazowe leku

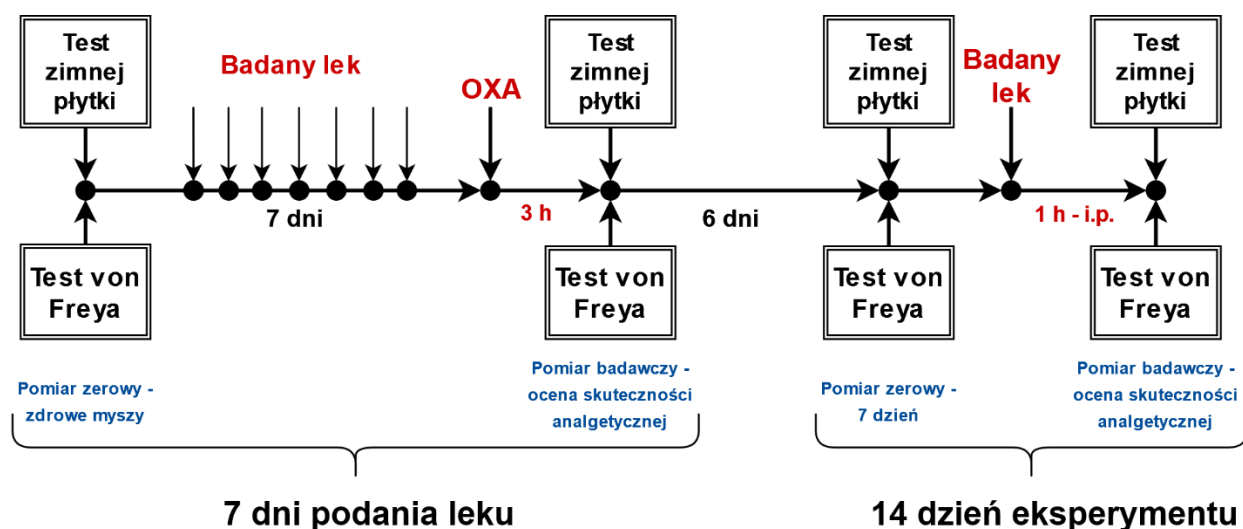
W schemacie profilaktyki jednorazowej badany lek podawano po wykonanym pomiarze zerowym pierwszego dnia eksperymentu. Następnie, po 1 h od podania substancji leczniczej zwierzęta otrzymywały oksaliplatynę. Kolejny pomiar w teście zimnej płytki i teście von Freya wykonywano po 3 h od podania cytostatyka. Po siedmiu dniach pomiary rozpoczynano od pomiarów zerowych, następnie zwierzęta otrzymywały roztwór badanego związku i po upływie 1 h wykonywano pomiar oceniający skuteczność analgetyczną (Rycina 7).



Rycina 7. Schemat podania profilaktycznego – podanie jednorazowe.

3.3.1.4 Schemat podania profilaktycznego – podanie wielokrotne leku

W przypadku profilaktyki wielokrotnej, po wykonaniu pomiaru zerowego, badany związek podawano codziennie przez siedem dni. Roztwór cytostatyka zwierzęta otrzymywały dopiero po tygodniu od rozpoczęcia eksperymentu, po czym analogicznie jak we wcześniejszych schematach, wykonywano pomiary w teście zimnej płytki i teście von Freya po 3 h po podaniu oksaliplatyny. Następnie eksperyment ponawiano po 7 dniach, wykonując pomiary analogicznie jak w przypadku wcześniejszych schematów (Rycina 8).

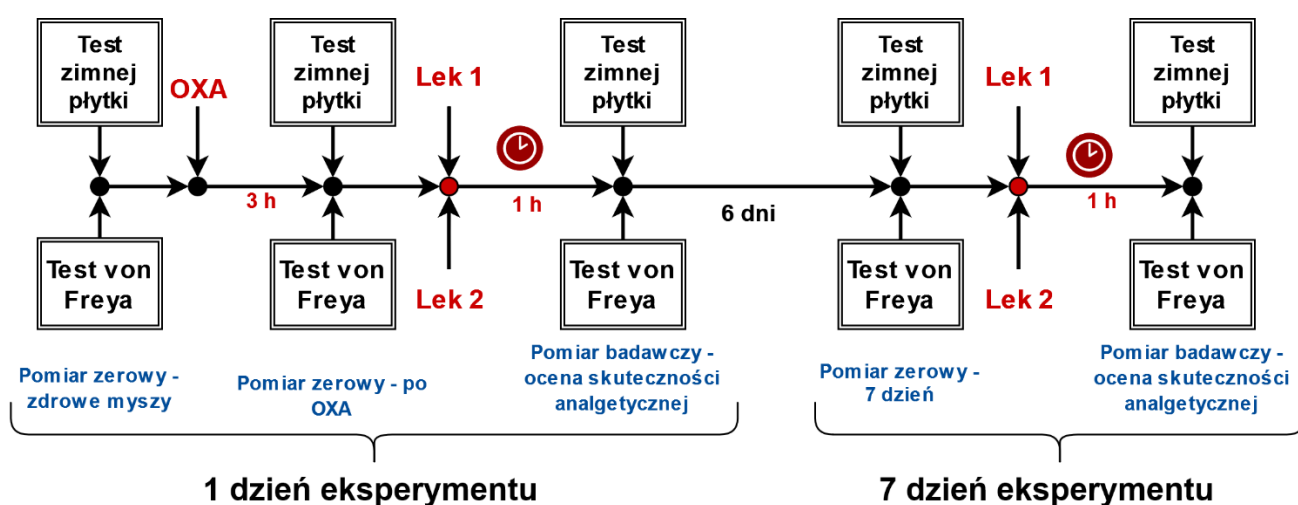


Rycina 8. Schemat podania profilaktycznego – podanie wielokrotne.

3.3.1.5 Podanie sekwencyjne dwóch leków

3.3.1.5.1 Podanie jednoczesne leków

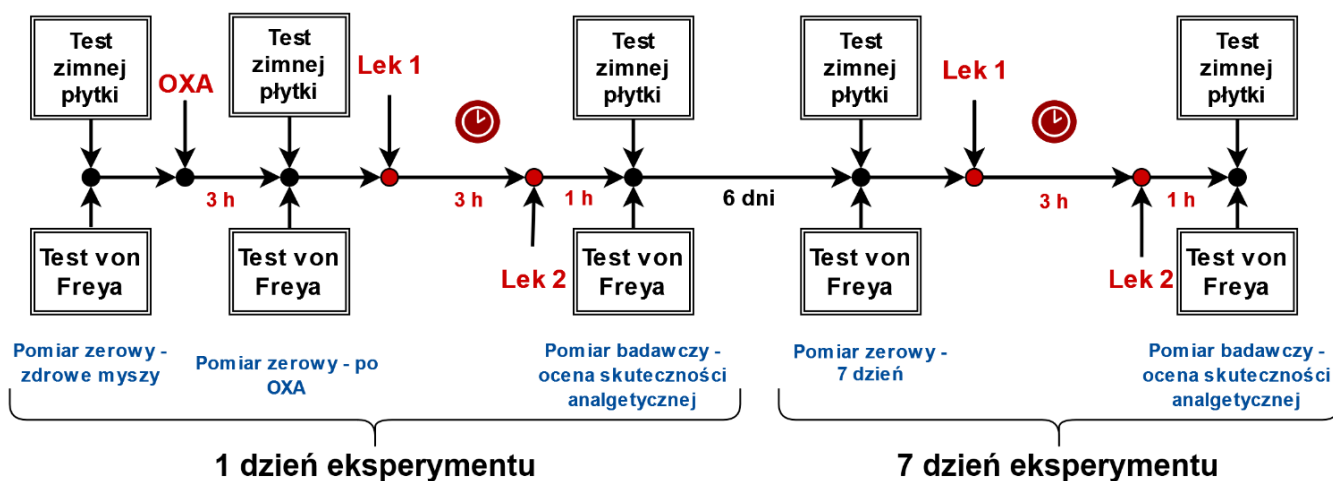
Podanie jednoczesne leków, jak i we wcześniejszych schematach, rozpoczynano od pomiaru zerowego, po którym zwierzęta otrzymywały dootrzewnowo roztwór oksaliplatyny, a następnie po upływie 3 h oceniano rozwój nadwrażliwości termicznej i mechanicznej w pierwszym dniu eksperymentu. W kolejnym etapie badane substancje podawano jednocześnie, jedna po drugiej i po upływie 1 h wykonywano pomiary oceniające skuteczność zastosowanego połączenia leków w łagodzeniu objawów nadwrażliwości. Po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny powtarzano czynności w sposób analogiczny jak pierwszego dnia eksperymentu i wykonywano pomiary oceniające skuteczność zastosowanej terapii w łagodzeniu objawów nadwrażliwości termicznej i mechanicznej w siódmym dniu pomiarów (Rycina 9).



Rycina 9. Schemat podania jednoczesnego dwóch związków.

3.3.1.5.2 Podanie leków z odstępem czasowym – wykonanie pomiaru nadwrażliwości po 4 h od podania pierwszego związku

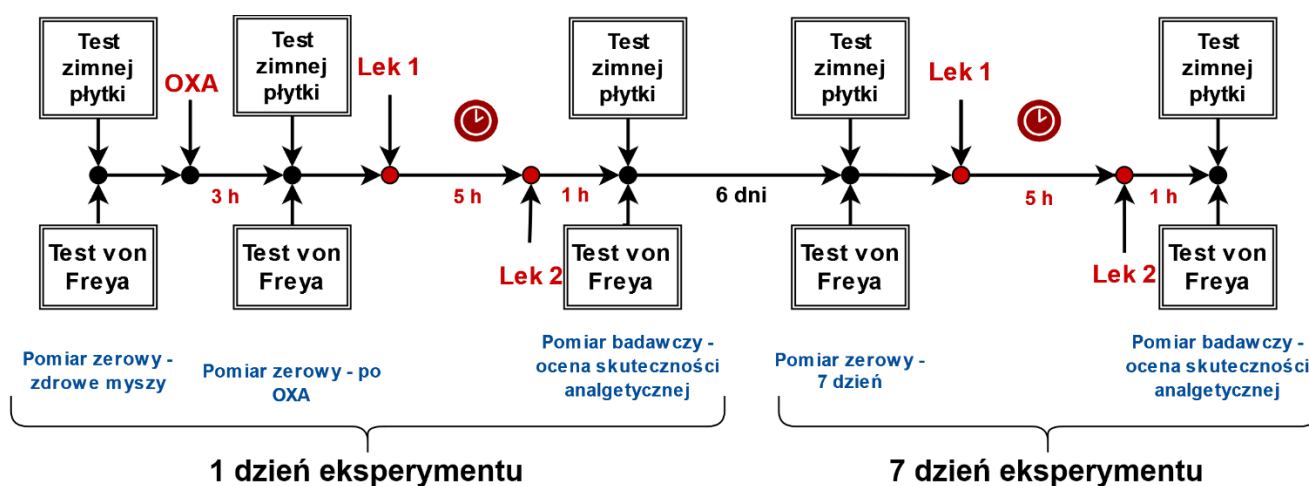
Podanie leków z odstępem czasowym rozpoczynano analogicznie jak w przypadku wcześniejszych pomiarów od wykonania pomiaru zerowego, podania oksaliplatyny i po upływie 3 h wykonania pomiarów oceniających rozwój nadwrażliwości termicznej i mechanicznej. Różnica, w stosunku do wcześniejszego schematu dotyczyła podania leków. Pierwszy lek zwierzęta otrzymywały niezwłocznie po zakończeniu wstępnych testów behawioralnych, natomiast drugi lek podawany był po upływie 3 h od podania pierwszego związku. Pomiary oceniające skuteczność zastosowanej terapii wykonywane były po upływie 1 h od podania drugiego leku (tj. 4 h od podania pierwszego związku). Siódmy dzień eksperymentu wyglądał analogicznie jak we wcześniejszych pomiarach, zachowując schemat podania badanych substancji z odstępem czasu (Rycina 10).



Rycina 10. Schemat podania dwóch leków z odstępem czasowym – wykonanie pomiarów po 4 h od podania pierwszego związku.

3.3.1.5.3 Podanie leków z odstępem czasowym – wykonanie pomiaru nadwrażliwości po 6 h od podania pierwszego związku

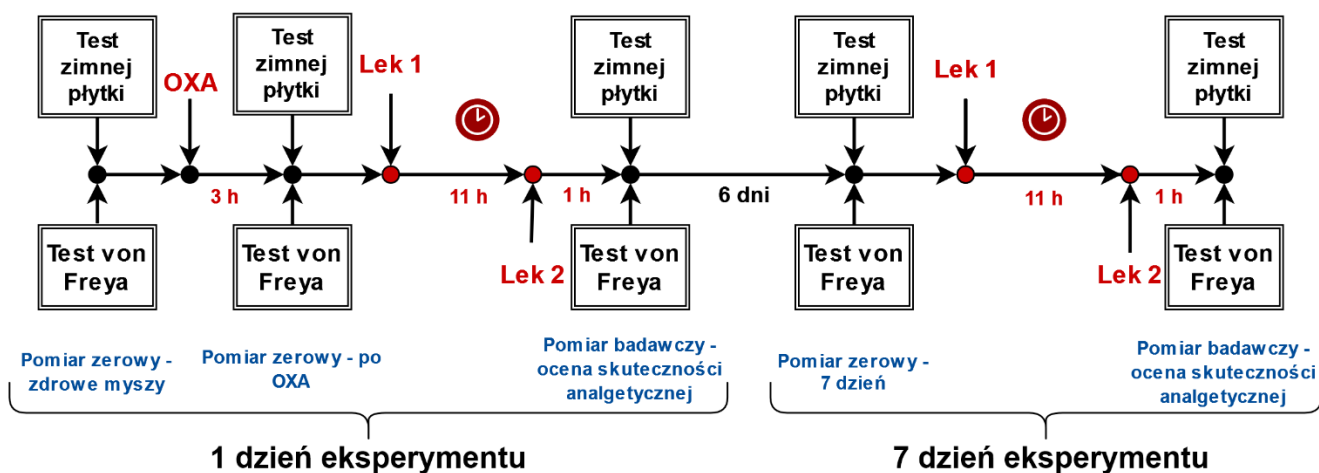
Analogicznie jak we wcześniejszym podaniu eksperyment rozpoczynał się od wykonania pomiarów zerowych i indukcji modelu CIPN poprzez podanie oksaliplatyny. Podanie leków z odstępem czasu rozpoczynano niezwłocznie po wykonaniu pomiarów wstępnych od podania pierwszego leku. Po upływie 5 h zwierzęta otrzymywały drugi związek i po 1 h wykonywano pomiary oceniające skuteczność zastosowanego połączenia w teście zimnej płytki i teście von Freya. Siódmy dzień eksperymentu wyglądał analogicznie jak we wcześniejszych pomiarach, zachowując schemat podania badanych substancji z odstępem czasu (Rycina 11).



Rycina 11. Schemat podania dwóch leków z odstępem czasowym – wykonanie pomiarów po 6 h od podania pierwszego związku.

3.3.1.5.4 Podanie leków z odstępem czasowym – wykonanie pomiaru nadwrażliwości po 12 h od podania pierwszego związku

Pomiary wstępne wykonywano analogicznie jak we wcześniejszych schematach. Następnie, pierwszy lek podawano niezwłocznie po zakończeniu testów behawioralnych oceniających rozwój nadwrażliwości po podaniu oksaliplatyny (testu zimnej płytki i testu von Freya), natomiast drugi lek zwierzęta otrzymywały po upływie 11 h od podania pierwszego leku. Pomiary oceniające skuteczność zastosowanej terapii wykonywano po upływie 1 h od podania drugiego leku (tj. 12 h od podania pierwszego związku). Siódmy dzień eksperymentu wyglądał analogicznie jak we wcześniejszych pomiarach, zachowując schemat podania badanych substancji z odstępem czasu (Rycina 12).



Rycina 12. Schemat podania dwóch leków z odstępem czasowym – wykonanie pomiarów po 12 h od podania pierwszego związku.

3.4 WYKONANE TESTY BEHAWIORALNE

3.4.1 Testy behawioralne oceniające rozwój neuropatii obwodowej

3.4.1.1 Indukcja neuropatii obwodowej za pomocą oksaliplatyny

Podanie oksaliplatyny w dawce 10 mg/kg pozwala na indukcję nadwrażliwości mechanicznej i termicznej u myszy jako objawów rozwiniętego zespołu neuropatii obwodowej. Pierwszego dnia testu zwierzęta otrzymywały drogą dootrzewnową pojedynczą dawkę oksaliplatyny (10 mg/kg). W przypadku CIPN indukowanej oksaliplatyną wczesne zmiany występują już w ciągu 2–3 h, natomiast późne obserwuje się kilka dni po podaniu cytostatyka. Ze względu, iż objawy nadwrażliwości wczesnej mogą różnić się od tych pojawiających się 24 h – 7 dni później oraz w oparciu o dane dokumentujące różną szybkość rozwoju nadwrażliwości termicznej i mechanicznej u zwierząt [103,291,292], aby w pełni scharakteryzować wpływ oksaliplatyny oraz badanych leków/związków chemicznych na rozwój i łagodzenie objawów nadwrażliwości, niniejsze badania przeprowadzono w dwóch punktach czasowych. Pomiarów wykonywano w dniu podania oksaliplatyny, po 3 h od jej wstrzyknięcia oraz po 7 dniach od jej podania. Pomiarów rozwoju nadwrażliwości mechanicznej wykonywano przy użyciu testu von Freya, natomiast nadwrażliwości termicznej w teście zimnej płytki [293].

3.4.1.2 Ocena nadwrażliwości termicznej indukowanej oksaliplatyną (test zimnej płytki)

Test zimnej płytki przeprowadzono stosując urządzenie do gorącej/zimnej płytki (Bioseb, Francja) o wymiarach płytki termicznej 165 × 165 mm. Temperatura płytki wynosiła $2.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. W ramach oceny rozwoju nadwrażliwości termicznej, zwierzęta po umieszczeniu na płytce obserwowano do momentu wystąpienia pierwszej reakcji bólowej, takiej jak: uniesienie łapy, gryzienie, potrząsanie tylnymi łapami, zaburzenia ruchu, podskoki oraz charakterystyczne przeciąganie się tułowia zwierząt. W celu uniknięcia uszkodzenia tkanek myszy ustalono maksymalny czas obserwacji wynoszący 60 s. Zwierzęta nieodpowiadające w ciągu 60 s wyjmowano z aparatu i przypisywano im wynik 60 s.

3.4.1.3 Ocena nadwrażliwości mechanicznej indukowanej oksaliplatyną (test von Freya)

Test von Freya przeprowadzono stosując urządzenie elektroniczne von Frey, tzw. elektroniczną podjednostkę von Frey (Bioseb, Francja), wyposażoną we włókno za pomocą, którego aplikowano zmienną siłę (od 0 do 10 g) do podszwowej powierzchni tylnej łapy myszy. Reakcja wycofania łapy w odpowiedzi na bodziec mechaniczny była rejestrowana przez aparat pomiarowy. W dniu eksperymentu myszy umieszczano pojedynczo w oddzielnych i nieprzezroczystych komorach testowych z dnem z siatki drucianej. W celu habituacji zwierzęta przebywały w komorach przez okres 1 h. W każdym punkcie czasowym pomiarów dokonywano trzykrotnie, zachowując odstęp czasowy pomiędzy pomiarami. Następnie z otrzymanych 3 pomiarów obliczano średnią.

3.4.2 Testy behawioralne oceniające wpływ badanych związków na funkcje motoryczne

3.4.2.1 Ocena wpływu na koordynację ruchową zwierząt w teście pręta obrotowego

W celu oceny wpływu zastosowanych leków i połączeń na koordynację ruchową zwierząt wykonywano test pręta obrotowego. Przed wykonaniem testu zwierzęta trenowano przez 3 kolejne dni na aparacie pręta obrotowego (aparat Rotarod, May Commat RR0711, Turcja; średnica pręta: 2 cm), który obracał się ze stałą prędkością 18 obrotów na minutę (rpm). W każdej sesji treningowej zwierzęta umieszczano na obracającym się pręcie na okres 3 minut z nieograniczoną liczbą prób. Właściwy eksperyment wykonywano 24 godziny po ostatnim treningu. Po podaniu badanych związków, wykonywano pomiar na pręcie obracającym się z prędkością 6, 18 i 24 rpm. Zaburzenia koordynacji ruchowej u zwierząt definiowano jako niezdolność do pozostania na obracającym się pręcie przez 1 min. Wyniki przedstawiano jako średni czas spędzony na obracającym się pręcie rotarod [294].

3.4.2.2 Ocena wpływu na spontaniczną aktywność lokomotoryczną

W celu oceny wpływu zastosowanych leków i połączeń na spontaniczną aktywność lokomotoryczną zwierzęta umieszczano w aparacie (40 × 40 × 31 cm, zaopatrzone w emitery promieni podczerwieni (IR); Activity Cage 7441, Ugo Basile, Włochy) na 30-minutowy okres habituacji, następnie rozpoczynał się 30-minutowy lub 60-minutowy pomiar ruchów wykonywanych przez mysz (poziome i pionowe przerwania wiązek IR rejestrowane jako ruch).

3.4.3 Metodyka pomiarów wykonanych w teście preferencji miejsca

Badania rozpoczęto od okresu habituacji zwierząt w aparaturze na dzień przed zaplanowanym właściwym eksperymentem. Do eksperymentu wybrano dwa leki: duloksetynę i pregabalinę. Pomiar wykonano w trzech punktach czasowych: pomiar u zwierząt, które nie otrzymały oksaliplatyny, pomiar po podaniu oksaliplatyny oraz pomiar po dootrzewnowym podaniu leków w dawce 30 mg/kg. Zwierzęta umieszczano każdorazowo na płytkach na okres 5 min. W ramach badania przebadano 9 różnych zakresów temperatur w przedziale: 0–45 °C, ustawiając płytki na temperatury różniące się o 5 °C, tj.: 0–5, 5–10, 10–15, 15–20, 20–25, 25–30, 30–35, 35–40 oraz 40–45 °C. Pomiar czasu przebywania zwierząt na poszczególnych płytkach oraz rejestracja zachowań zwierząt odbywała się poprzez nagrywanie myszy umieszczonych w analgezymetrze kamerą (GoPro Hero7 Black, San Mateo, CA, USA), a następnie analizę nagrań umożliwiającą policzenie % czasu spędzanego przez zwierzę na poszczególnych płytkach.

3.5 ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW

Analizę wyników badań behawioralnych przeprowadzono za pomocą oprogramowania GraphPad Prism (wersja 5.0, 6.0, 7.0 i 8.0, USA). Wyniki liczbowe są wyrażone jako wartość średnia \pm SEM. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji, a następnie porównania *post hoc* Dunnetta lub analizy wariancji z powtarzanymi pomiarami, a następnie porównania *post hoc* Bonferroniego lub Tukeya dla pomiarów wykonywanych w teście zimnej płytki i teście von Freya.

W przypadku pomiarów uzyskanych w ostatnim etapie badań przy użyciu nowej aparatury, wyniki uzyskane w testach behawioralnych zostały wyrażone jako % czasu spędzanego w każdej strefie termicznej. Ocenę statystyczną wyników przeprowadzono za pomocą analizy wariancji z powtarzanymi pomiarami, a następnie porównania *post hoc* Tukeya dla porównań grupowych wykonanych w różnych punktach czasowych (tj. przed podaniem oksaliplatyny, przed podaniem leku i po podaniu leku). We wszystkich testach za istotne uznawano $P < 0.05$.

4 WYNIKI

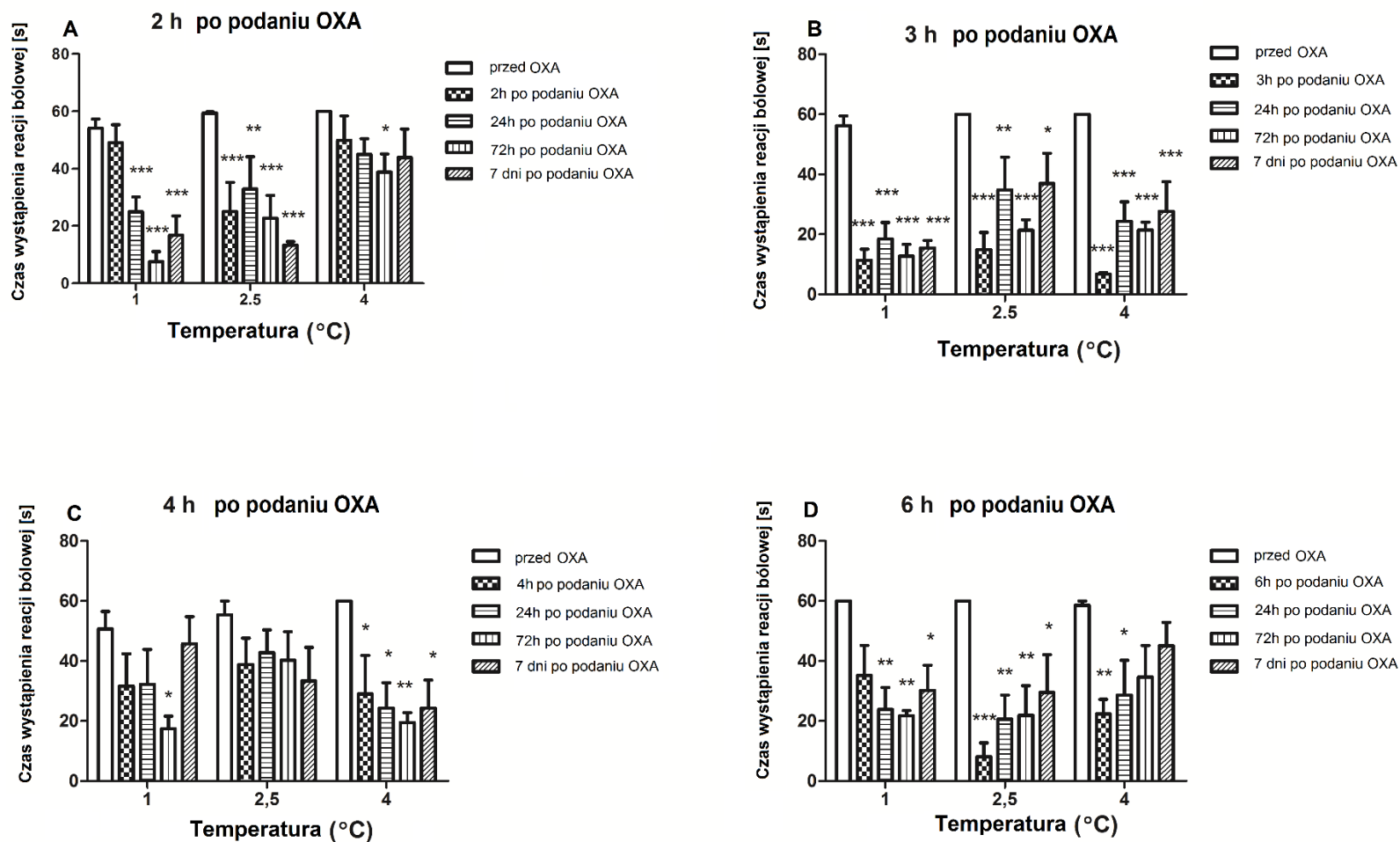
4.1 MODEL TOKSYCZNEJ NEUROPATII INDUKOWANEJ OKSALIPLATYNĄ – SELEKCJA TEMPERATUR DO BADAŃ WPŁYWU ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY

Z uwagi na rozbieżne dane literaturowe dotyczące zakresu wartości temperatur stosowanych w badaniach progu bólowego u myszy w teście zimnej płytki [39,103,295], rozpoczynając badania sprawdzono u gryzoni zachowania związane z bólem w teście zimnej płytki w temperaturach 1 °C, 2.5 °C oraz 4 °C w kilku punktach czasowych od podania oksaliplatyny: 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24 h, 72 h oraz 7 dni. Wykres A – pomiar pierwszego dnia eksperymentu wykonywano po 2 h od podania oksaliplatyny, w trzech wyselekcjonowanych temperaturach płytki; Wykres B – pomiar pierwszego dnia eksperymentu wykonywano po 3 h od podania oksaliplatyny, w trzech wyselekcjonowanych temperaturach płytki; Wykres C – pomiar pierwszego dnia eksperymentu wykonywano po 4 h od podania oksaliplatyny, w trzech wyselekcjonowanych temperaturach płytki; Wykres D – pomiar pierwszego dnia eksperymentu wykonywano po 6 h od podania oksaliplatyny, w trzech wyselekcjonowanych temperaturach płytki.

W wyniku podania oksaliplatyny zaobserwowano istotne skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej u zwierząt w teście zimnej płytki w temperaturze 1 °C (efekt „badanego związku”: $F_{7,85}=15.50$, $P<0.0001$), 2.5 °C (efekt „badanego związku”: $F_{7,77}=21.19$, $P<0.0001$) oraz 4 °C (efekt „badanego związku”: $F_{7,80}=21.23$, $P<0.0001$). W przypadku zastosowanej temperatury 1 °C oraz 4 °C taka reakcja została zaobserwowana dopiero po 3 h od podania oksaliplatyny ($P<0.001$, Rycina 13B) i utrzymywała się do końca trwania eksperymentu. W przypadku zastosowania temperatury 2.5 °C istotne statystycznie skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej w porównaniu do pomiaru zerowego u zwierząt przed podaniem oksaliplatyny zostało zaobserwowane już po 2 h od podania oksaliplatyny ($P<0.001$, Rycina 13A) i również utrzymywało się do końca trwania eksperymentu.

Zastosowanie różnych temperatur płytki oraz różnego czasu obserwacji po podaniu oksaliplatyny w pierwszym dniu eksperymentu pozwoliło na wyselekcjonowanie najoptymalniejszych warunków przeprowadzania pomiarów. Co więcej, wykonanie badań po 24 h, 72 h i 7 dniach po podaniu chemioterapeutyku umożliwiło monitorowanie zmian zachodzących w czasie po podaniu oksaliplatyny oraz natężenia nadwrażliwości termicznej w zależności od określonego punktu czasowego i temperatury płytki. Dzięki wykonanemu badaniu przesiewowemu (czas-temperatura) najoptymalniejsze warunki zaobserwowano po 3 h od podania oksaliplatyny na płytce o temperaturze 2.5 °C. Ponadto, zastosowana pojedyncza dawka tego chemioterapeutyku była wystarczająca zarówno do wywołania CIPN pierwszego dnia eksperymentu, jak i indukowania zmian odpowiedzialnych za wywołanie nadwrażliwości po siedmiu dniach od wstrzyknięcia (Rycina 13).

Niniejsze wyniki opublikowano w pracy: Furgała, A., Sałat, R., & Sałat, K. (2018). Acute cold allodynia induced by oxaliplatin is attenuated by amitriptyline. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 78, 315-321.



Rycina 13. Wpływ oksaliplatyny podawanej dootrzewnowo na czas wystąpienia reakcji bólowej u myszy.

Reakcję bólową mierzono w teście zimnej płytki w różnych temperaturach i różnych punktach czasowych. Wyniki przedstawiono jako czas wystąpienia reakcji bólowej (podnoszenie, gryzienie, potrząsanie tylnymi łapami, podskakiwanie, deficyty ruchu) w temperaturze 1 °C, 2,5 °C lub 4 °C po 2 h (A), 3 h (B), 4 h (C) i 6 h (D) po podaniu oksaliplatyny (±SEM) dla n=6–10. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa analiza wariancji i test *post hoc* Dunnetta. Znamienność statystyczna w porównaniu z pomiarem przed podaniem oksaliplatyny: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001. Skrót: OXA – oksaliplatyna.

4.2 ANALIZA SKUTECZNOŚCI WYBRANYCH LEKÓW I ZWIĄZKÓW W MODELU NEUROPATII OBWODOWEJ INDUKOWANEJ OKSALIPLATYNĄ

4.2.1 Badanie oceniające skuteczność duloksetyny

4.2.1.1 Podanie jednorazowe i wielokrotne duloksetyny

Biorąc pod uwagę rekomendacje [152] oraz skuteczność terapeutyczną duloksetyny oceniono aktywność przeciwbólową tego leku w modelu zwierzęcym CIPN, stosując różne dawki i schematy podania, w tym podanie wielokrotne. Rozpoczynając pomiary wyznaczono dawkę efektywną i podprogową. Dodatkowo postanowiono ocenić skuteczność tego leku w schemacie podania wielokrotnego.

Skuteczność analgetyczną duloksetyny oceniono w teście von Freya i zimnej płytki. Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{5,53}=26.54$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3,586,19}=73.61$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{20,212}=5.134$, $P<0.0001$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{5,54}=131.1$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3,183,171.9}=297.2$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{20,216}=67.41$, $P<0.0001$.

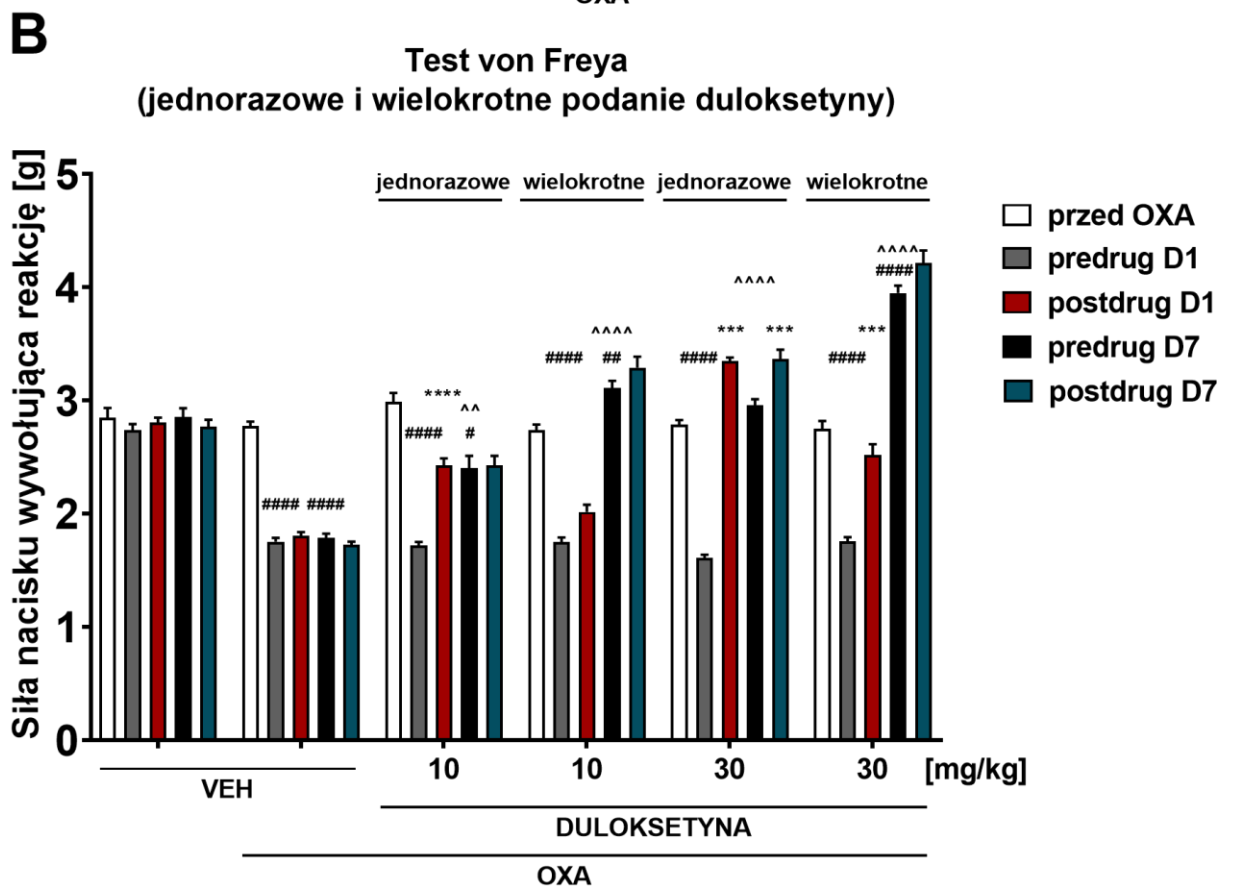
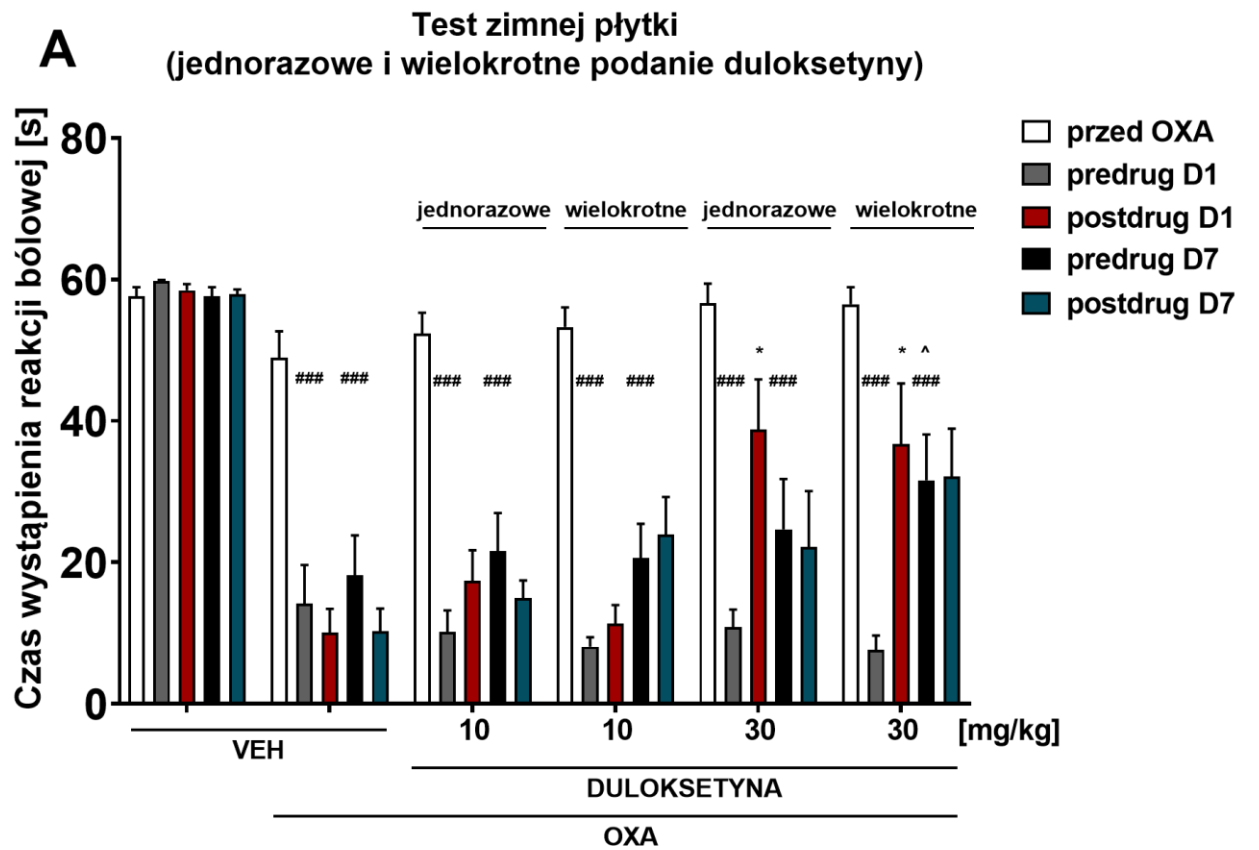
W teście zimnej płytki podanie oksaliplatyny spowodowało istotne statystycznie skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej pierwszego dnia eksperymentu we wszystkich grupach eksperymentalnych ($P<0.001$, Rycina 14A). Efekt ten utrzymał się do siódmego dnia pomiarów również we wszystkich grupach ($P<0.001$, Rycina 14A), przy czym w grupie, która otrzymywała duloksetynę wielokrotnie w dawce 30 mg/kg efekt ten był najślabszy i w porównaniu do pomiaru po podaniu oksaliplatyny uzyskanego dnia pierwszego był znamienne wyższy ($P<0.05$, Rycina 14A). Istotne statystycznie działanie łagodzące objawy nadwrażliwości termicznej zaobserwowano wyłącznie pierwszego dnia eksperymentu dla duloksetyny podawanej w dawce 30 mg/kg ($P<0.05$, Rycina 14A).

W teście von Freya podanie oksaliplatyny pierwszego dnia wywołało rozwój nadwrażliwości mechanicznej we wszystkich grupach eksperymentalnych ($P<0.0001$, Rycina 14B). Jednorazowe podanie duloksetyny w dawkach 10 i 30 mg/kg wykazało działanie przeciwbólowe na objawy nadwrażliwości mechanicznej i podwyższało próg reakcji bólowej w pierwszym dniu eksperymentu ($P<0.0001$ - podanie jednorazowe duloksetyny w dawce 10 mg/kg; $P<0.001$ - duloksetyna podana w dawce 30 mg/kg, Rycina 14B). Jednorazowe i wielokrotne podanie duloksetyny w dawkach 10 mg/kg i 30 mg/kg hamowało rozwój nadwrażliwości późnej w siódmym dniu eksperymentu, znamienne podwyższając wartość siły nacisku wywołującej reakcję w porównaniu do pomiaru po podaniu cytostatyka uzyskanego pierwszego dnia pomiarów ($P<0.0001$, oprócz jednorazowego podania duloksetyny w dawce 10 mg/kg: $P<0.01$, Rycina 14B).

Znamienny wpływ łagodzący objawy nadwrażliwości mechanicznej rozwijającej się po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny wywołało podanie duloksetyny wyłącznie w dawce 30 mg/kg w schemacie podania jednorazowego ($P<0.001$, Rycina 14B). Jednak należy zwrócić uwagę na fakt, iż wielokrotne podanie duloksetyny w dawkach 10 i 30 mg/kg prowadziło do znamienego podwyższenia wartości pomiarów w dniu siódmym, osiągając porównywalny poziom jak u zwierząt, które nie otrzymały oksaliplatyny. Stąd prawdopodobnie, dodatkowe podanie leku w siódmym dniu eksperymentu nie podwyższało już i tak wysokich wartości pomiarów siły nacisku.

Rycina 14. Wpływ duloksetyny (10 i 30 mg/kg, i.p.) podawanej jednorazowo i wielokrotnie na próg bólowy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla n=10 (± SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: # P<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001, #### P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły wywołującej reakcję bólową przed podaniem duloksetyny w odpowiednim punkcie czasowym: * P<0.05, *** P<0.001, **** P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar po podaniu oksaliplatyny pierwszego dnia: ^ P<0.05, ^^ P<0.01, ^^^ P<0.0001. OXA – oksaliplatyna, predrug – pomiar przed podaniem duloksetyny, postdrug – pomiar po podaniu duloksetyny, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu. Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.



4.2.1.2 Podanie profilaktyczne duloksetyny

Duloksetyna oprócz właściwości łagodzących objawy bólu neuropatycznego, w tym CIPN, jest również ważnym lekiem stosowanym w profilaktyce rozwoju bólu neuropatycznego jako powikłania leczenia onkologicznego [246]. Obserwując, zarówno po podaniu pojedynczym i wielokrotnym duloksetyny, tendencję do hamowania rozwoju nadwrażliwości termicznej i mechanicznej w siódmym dniu eksperymentu, zaplanowano badanie mające na celu ocenę potencjału profilaktycznego tego leku przed wstrzyknięciem oksaliplatyny, podawanego jednorazowo i wielokrotnie w dawkach 10 i 30 mg/kg.

Skuteczność profilaktyczną oceniono w teście zimnej płytki i teście von Freya. W schemacie profilaktyki jednorazowej: test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku” $F_{3,36}=7.791$, $P<0.001$; efekt „czasu” $F_{2,72}=84.11$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{6,72}=3.25$, $P<0.01$* ; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku” $F_{3,36}=30.35$, $P<0.0001$; efekt „czasu” $F_{2,72}=54.50$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{6,72}=33.65$, $P<0.0001$.*

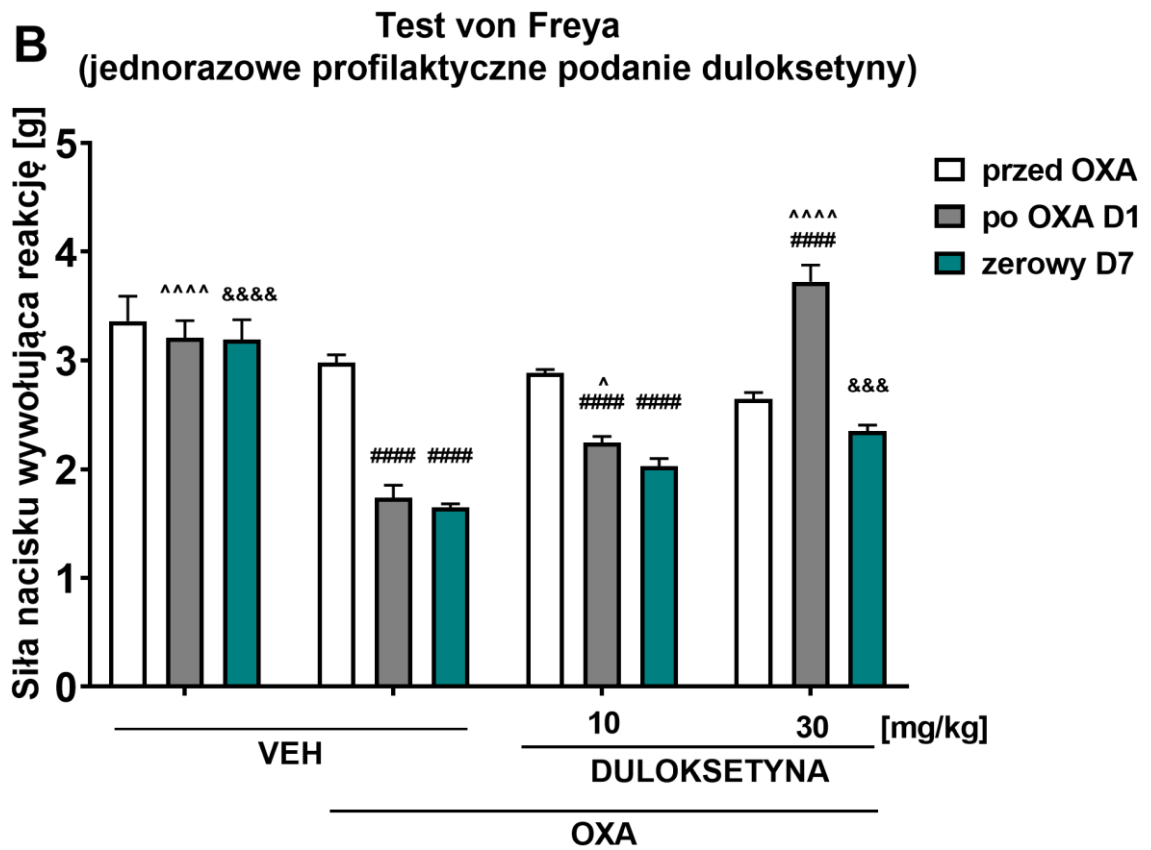
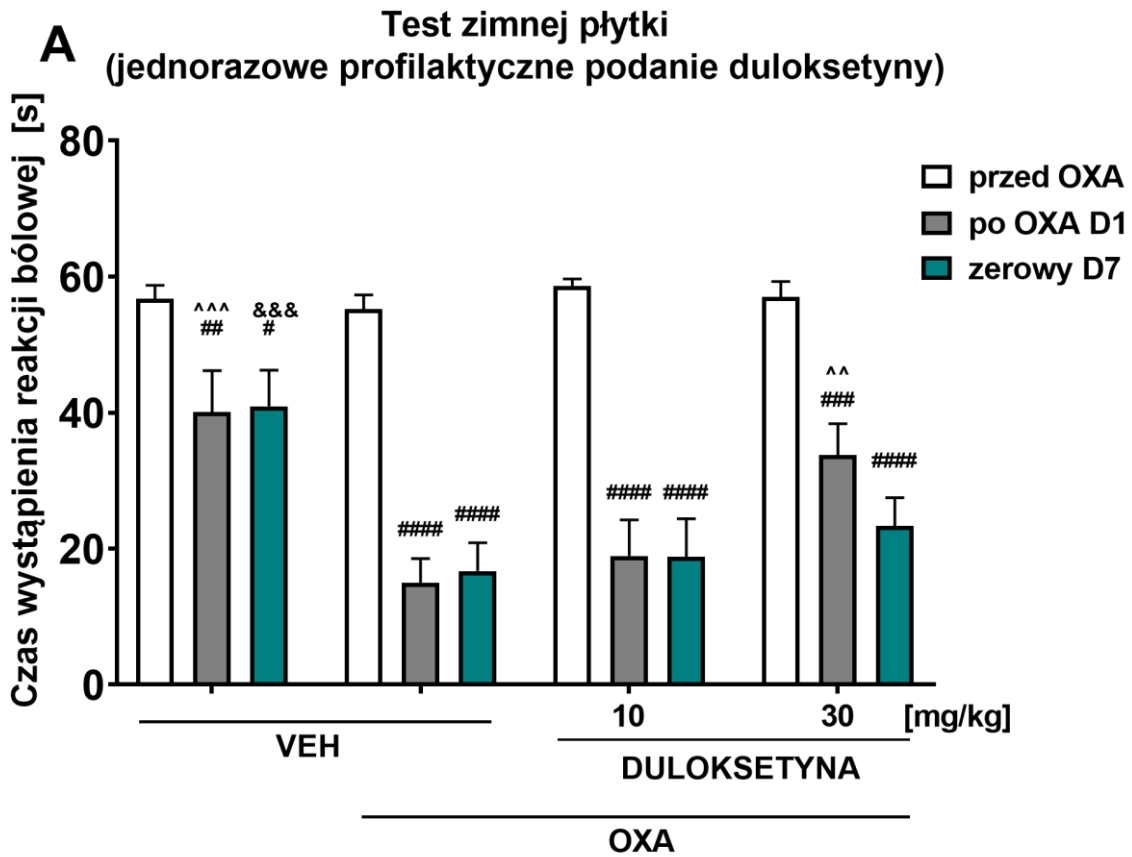
W schemacie profilaktyki wielokrotnej: test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku” $F_{2,22}=14.04$, $P=0.0001$; efekt „czasu” $F_{4,88}=18.18$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{8,88}=7.245$, $P<0.0001$* ; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku” $F_{2,27}=39.17$, $P<0.0001$; efekt „czasu” $F_{4,108}=8.809$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{8,108}=22.07$, $P<0.0001$.*

W teście zimnej płytki w pierwszym dniu eksperymentu, pomimo podania duloksetyny na 1 godzinę przed podaniem oksaliplatyny nie wykazano profilaktycznego efektu zastosowanego leku zarówno w dawce 10 mg/kg, jak i 30 mg/kg. Podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej w grupie, która otrzymała duloksetynę w dawkach 10 mg/kg ($P<0.0001$, Rycina 15A) i 30 mg/kg ($P<0.001$, Rycina 15A). Dodatkowo efekt ten utrzymywał się siedem dni po podaniu cytostatyka ($P<0.0001$, Rycina 15A). Jednakże, w pierwszym dniu po podaniu oksaliplatyny, jednorazowe podanie duloksetyny w dawce 30 mg/kg przed podaniem cytostatyka wydłużało w sposób istotny statystycznie czas wystąpienia reakcji bólowej w stosunku do grupy kontrolnej, która otrzymała oksaliplatynę ($P<0.01$, Rycina 15A).

W teście von Freya pojedyncze podanie duloksetyny w dawce 10 mg/kg przed podaniem oksaliplatyny nie wykazało istotnego działania ochronnego w pierwszym i siódmym dniu pomiarów ($P<0.0001$, Rycina 15B), aczkolwiek wartość prognozy reakcji bólowej po podaniu cytostatyka pierwszego dnia była wyższa niż wartość uzyskana dla grupy kontrolnej, która otrzymała wyłącznie oksaliplatynę ($P<0.05$, Rycina 15B). Podanie duloksetyny w dawce 30 mg/kg na 1 godzinę przed podaniem oksaliplatyny wywołało silne działanie ochronne i zahamowało rozwój nadwrażliwości mechanicznej w pierwszym dniu eksperymentu w stosunku do pomiaru siły nacisku przed podaniem oksaliplatyny oraz pomiaru grupy kontrolnej otrzymującej cytostatyk ($P<0.0001$, Rycina 15B). Co więcej, w porównaniu do kontroli, która otrzymała oksaliplatynę pojedyncza profilaktyczna dawka 30 mg/kg duloksetyny znacząco hamowała rozwój nadwrażliwości mechanicznej w siódmym dniu pomiarów ($P<0.001$, Rycina 15B).

Rycina 15. Wpływ duloksetyny (10 i 30 mg/kg, i.p.) podawanej profilaktycznie jednorazowo na próg bólowy zwierząt mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz w 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla n=10 (± SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: # P<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001, #### P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję po oksaliplatynie grupy kontrolnej, która otrzymała cytostatyk: ^ P<0.05, ^^ P<0.01, ^^^ P<0.001, ^^^^ P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar zerowy siódmego dnia grupy kontrolnej, która otrzymała cytostatyk: &&& P<0.001, &&&& P<0.0001. OXA – oksaliplatyna, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu. Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.



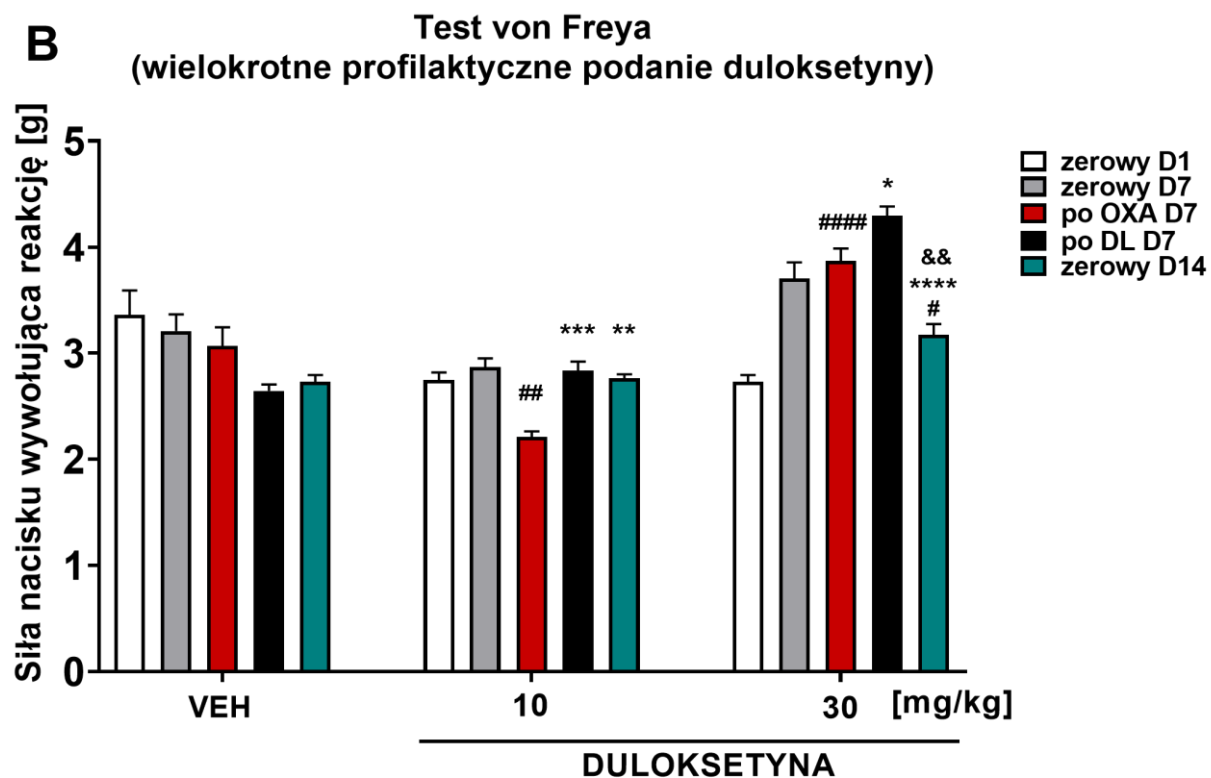
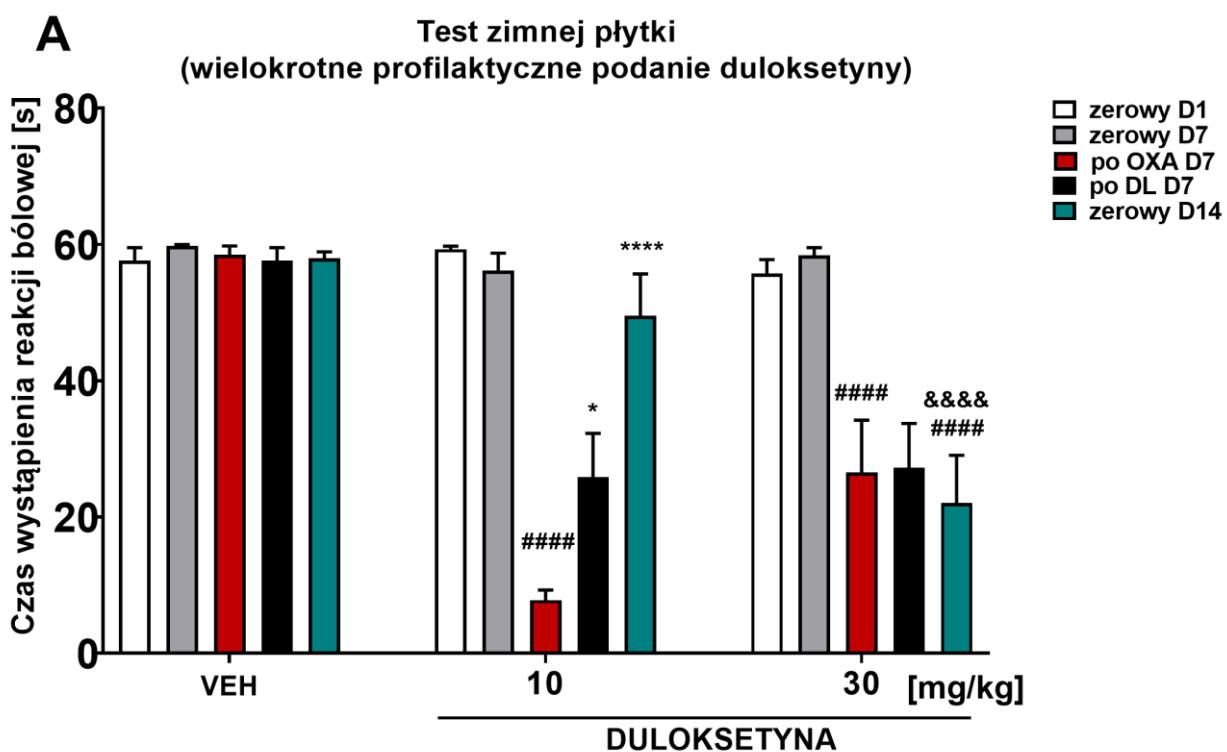
W schemacie prewencji wielokrotnej, w teście zimnej płytki podanie duloksetyny w dawkach 10 i 30 mg/kg nie wykazało działania ochronnego na rozwój nadwrażliwości termicznej po podaniu oksaliplatyny w pierwszym dniu podania cytostatyka (7 dzień eksperymentu; $P < 0.0001$, Rycina 16A). Co ciekawe, wielokrotnie profilaktycznie podana duloksetyna w dawce 10 mg/kg wykazała działanie ochronne, hamujące rozwój nadwrażliwości po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny istotnie statystycznie podnosząc próg bólowy w stosunku do pomiaru po podaniu cytostatyka ($P < 0.0001$, Rycina 16A), oraz podana po oksaliplatynie wykazała efekt przeciwbólowy ($P < 0.05$, Rycina 16A). Podanie wielokrotne duloksetyny w dawce 30 mg/kg przed podaniem oksaliplatyny nie wykazało efektu profilaktycznego zarówno w dniu podania cytostatyka oraz po siedmiu dniach od jego podania, zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie progu bólowego ($P < 0.0001$, Rycina 16A).

W teście von Freya wielokrotne podanie duloksetyny w dawce 10 mg/kg nie ochroniło przed rozwojem nadwrażliwości mechanicznej w pierwszym dniu podania cytostatyka (7 dzień eksperymentu; $P < 0.01$, Rycina 16B). Natomiast, dodatkowe podanie duloksetyny (w siódmym dniu eksperymentu) po oksaliplatynie wykazało istotny statystycznie efekt przeciwbólowy ($P < 0.001$, Rycina 16B). Duloksetyna podana zwierzętom w dawce 10 mg/kg wielokrotnie wykazała działanie ochronne na rozwój późnej nadwrażliwości, istotnie statystycznie podwyższając wartość pomiaru otrzymanego po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny (14 dzień eksperymentu), w porównaniu do pomiaru w pierwszym dniu podania cytostatyka ($P < 0.01$, Rycina 16B).

Podanie duloksetyny w wysokiej dawce – 30 mg/kg przez 7 dni przed podaniem oksaliplatyny wywołało silny efekt profilaktyczny, znacząco podwyższając próg bólowy pomimo podania oksaliplatyny (7 dzień eksperymentu; $P < 0.0001$, Rycina 16B). Pomiar otrzymany po siedmiu dniach od wstrzyknięcia cytostatyka (14 dzień eksperymentu) był niższy niż w pierwszym dniu podania oksaliplatyny ($P < 0.0001$, Rycina 16B), jednakże był znamienne wyższy w stosunku do pomiaru siły nacisku otrzymanej dla grupy kontrolnej, która nie otrzymała oksaliplatyny ($P < 0.01$, Rycina 16B).

Rycina 16. Wpływ duloksetyny (10 i 30 mg/kg, i.p.) podawanej wielokrotnie profilaktycznie na próg bólowy zwierząt mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano pierwszego dnia podania duloksetyny (D1), w dniu podania oksaliplatyny (D7) oraz w 7 dni po podaniu cytostatyka (D14). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla n=5–10 (± SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny, pierwszy dzień pomiarów: # P<0.05, ## P<0.01, ##### P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję po podaniu oksaliplatyny: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar zerowy 14 dnia grupy kontrolnej: && P<0.01, &&&& P<0.0001. OXA – oksaliplatyna, DL – duloksetyna, D1 – dzień rozpoczęcia podania duloksetyny, D7 – dzień podania oksaliplatyny, D14 – 14 dzień eksperymentu. Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.

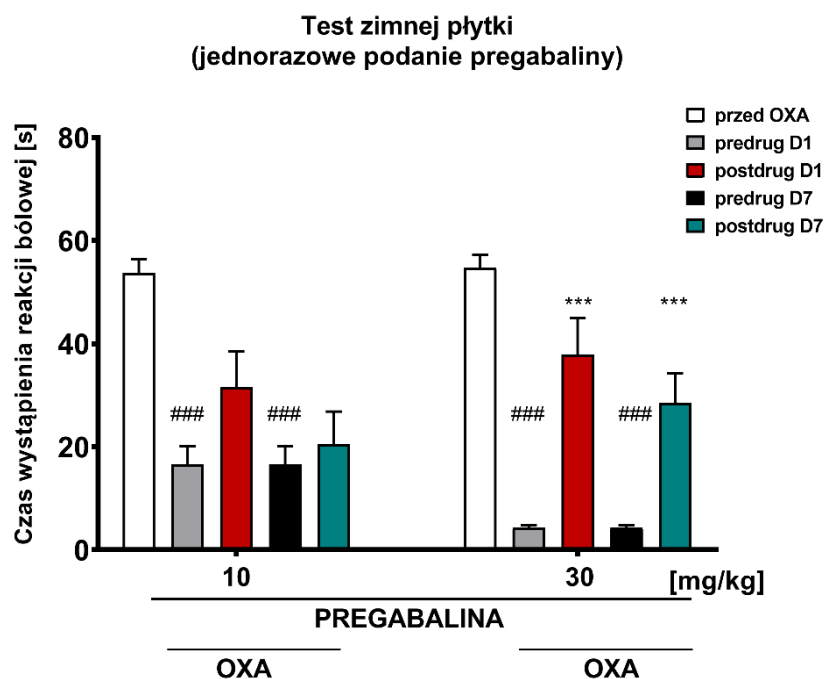


4.2.2 Badanie oceniające skuteczność pregabaliny

Pregabalina była jednym z pierwszych leków rekomendowanych w celu leczenia i łagodzenia objawów bólu neuropatycznego ze względu na obiecującą skuteczność analgetyczną oraz mechanizm działania oparty na hamowaniu aktywności VGCCs. Z uwagi na fakt, iż kanałopatie odgrywają jedną z kluczowych ról w patogenezie rozwoju CIPN, skuteczność monoterapii pregabaliną wśród pacjentów jest niewystarczająca oraz w oparciu o dane literaturowe [296] i rekomendacje kliniczne [152] postanowiono ocenić skuteczność pregabaliny w łagodzeniu objawów neuropatii obwodowej w modelu zwierzęcym CIPN, a wyniki wykorzystać w kolejnych etapach badań.

We wstępnym etapie została wyznaczona dawka aktywna i podprogowa dla pregabaliny w teście zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{3,36}=1.794$, $P>0.05$; *efekt „czasu”* $F_{4,144}=97.30$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{12,144}=3.72$, $P<0.0001$.

Podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie obniżenie progu bólowego pierwszego i siódmego dnia eksperymentu w obu grupach eksperymentalnych ($P<0.001$, Rycina 17). W teście zimnej płytki podanie pregabaliny w dawce 10 mg/kg nie wywołało istotnego statystycznie wydłużenia czasu wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na działający bodziec termiczny (niską temperaturę). Skuteczną dawką okazała się dawka 30 mg/kg, której podanie znamienne wydłużało czas wystąpienia reakcji nocyceptywnej pierwszego i siódmego dnia eksperymentu ($P<0.001$, Rycina 17).



Rycina 17. Wpływ pregabaliny (10 i 30 mg/kg, i.p.) na próg bólowy zwierząt mierzony w teście zimnej płytki.

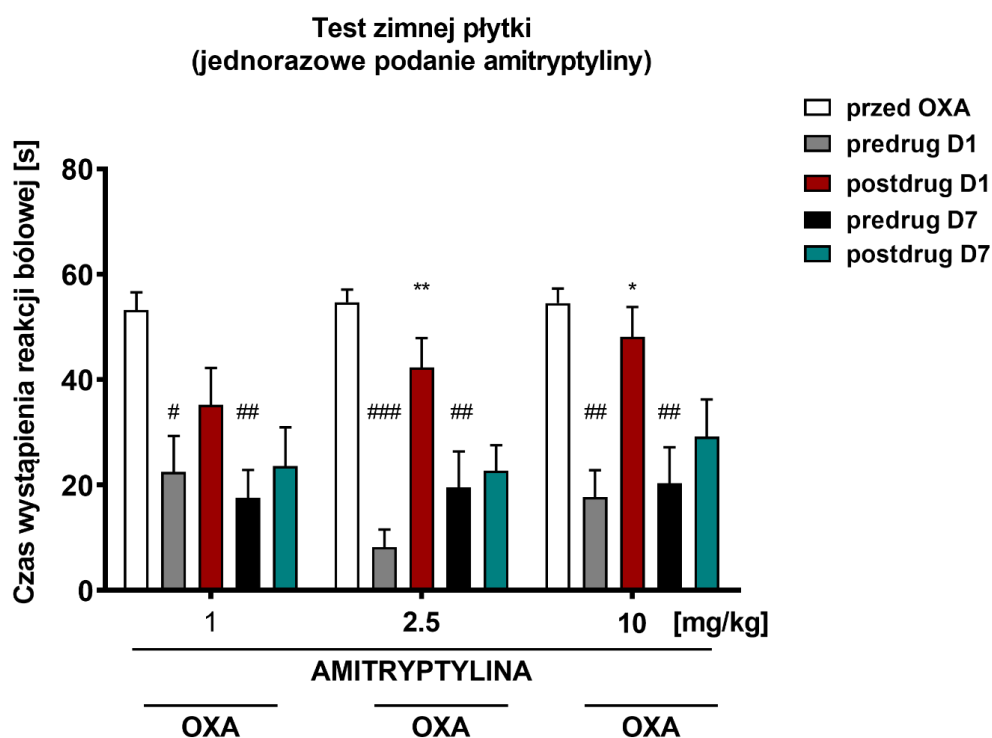
Nadwrażliwość termiczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej (\pm SEM) w odpowiedzi na stymulację termiczną (temperatura 2.5 °C) dla $n = 10$. Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami i test *post hoc* Bonferroniego. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ### $P<0.001$; znamienność statystyczna vs. czas wystąpienia reakcji bólowej przed podaniem pregabaliny w odpowiednim punkcie czasowym: *** $P<0.001$. OXA – oksaliplatyna, predrug – pomiar przed podaniem pregabaliny, postdrug – pomiar po podaniu pregabaliny, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu.

4.2.3 Badanie oceniające skuteczność amitryptyliny

Ze względu na mechanizm działania i skuteczność terapeutyczną, TLPD rekomendowane są jako leki pierwszego wyboru leczenia bólu neuropatycznego [152]. Amitryptylina, poza hamowaniem resorpcji zwrotnej NA i 5-HT w układzie nerwowym, dodatkowo blokuje VGSCs, VGCCs i jest antagonistą receptorów NMDAR, muskarynowych, α -adrenergicznych i H_1 -histaminowych. Wpływ na wychwyt NA, 5-HT, VGSCs, VGCCs i NMDAR to mechanizmy, które mogą odpowiadać za hamowanie bólu [297]. Jednak dane literaturowe dotyczące zastosowania amitryptyliny w leczeniu neuropatii wywołanej chemioterapią są niejednoznaczne.

W początkowym etapie wyznaczono dla amitryptyliny dawkę aktywną i podprogową. W tym celu zostały przebadane 3 dawki leku: 1 mg/kg, 2.5 mg/kg i 10 mg/kg. Analiza wariancji wykazała istotny efekt „badanego związku” $F_{14,135}=7.676$, $P<0.0001$. Spośród przebadanych dawek istotną statystycznie skuteczność przeciwbólową wykazała amitryptylina w dawkach 2.5 mg/kg ($P<0.01$, Rycina 18) i 10 mg/kg ($P<0.05$, Rycina 18) pierwszego dnia eksperymentu, bez wpływu na pomiar wykonany po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny.

Wyniki niniejszego eksperymentu opublikowano w pracy: Furgała, A., Sałat, R., & Sałat, K. (2018). Acute cold allodynia induced by oxaliplatin is attenuated by amitriptyline. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 78, 315-321.



Rycina 18. Wpływ amitryptyliny (1, 2.5 i 10 mg/kg, i.p.) na próg bólowy zwierząt mierzony w teście zimnej płytki.

Nadwrażliwość termiczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej (\pm SEM) w odpowiedzi na stymulację termiczną (temperatura 2.5 °C) dla $n = 10$. Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanimi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$; znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem amitryptyliny w odpowiednim punkcie czasowym: * $P<0.05$, ** $P<0.01$. OXA – oksaliplatyna, przedrug – pomiar przed podaniem amitryptyliny, postdrug – pomiar po podaniu amitryptyliny, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu.

4.2.4 Badanie oceniające skuteczność lakozamidu

Lakozamid należy do nowej klasy leków przeciwpadaczkowych, którego mechanizm działania do tej pory nie został jeszcze dobrze poznany. Przyjmuje się, że lakozamid selektywnie wzmacnia powolną dezaktywację VGSCs, prowadząc do stabilizacji błony komórkowej nadmiernie pobudliwych neuronów oraz wiąże się z białkiem mediatora odpowiedzi na kolapsynę 2 (ang. *collapsin response mediator protein 2*, CRMP-2) biorącym udział w różnicowaniu i kontroli odrastania aksonów oraz prawdopodobnie epileptogenezie [298,299]. Zarówno wpływ na VGSCs, jak również modulacja CRMP-2 mogą prawdopodobnie modyfikować przebieg choroby jaką jest ból neuropatyczny, stąd też lakozamid wykorzystano w badaniach z udziałem ludzi i zwierząt oceniając jego aktywność w różnych rodzajach bólu neuropatycznego [274,289,300,301].

W pierwszym etapie badań wyznaczono dawkę aktywną i podprogową lakozamidu. W tym celu lakozamid przebadano w dawkach 10 i 30 mg/kg. Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{2,24}=93.64$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{2,620,62.88}=78.32$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{8,96}=26.50$, $P<0.0001$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{2,27}=39.63$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{2,715,73.31}=52.33$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{8,108}=10.11$, $P<0.0001$.

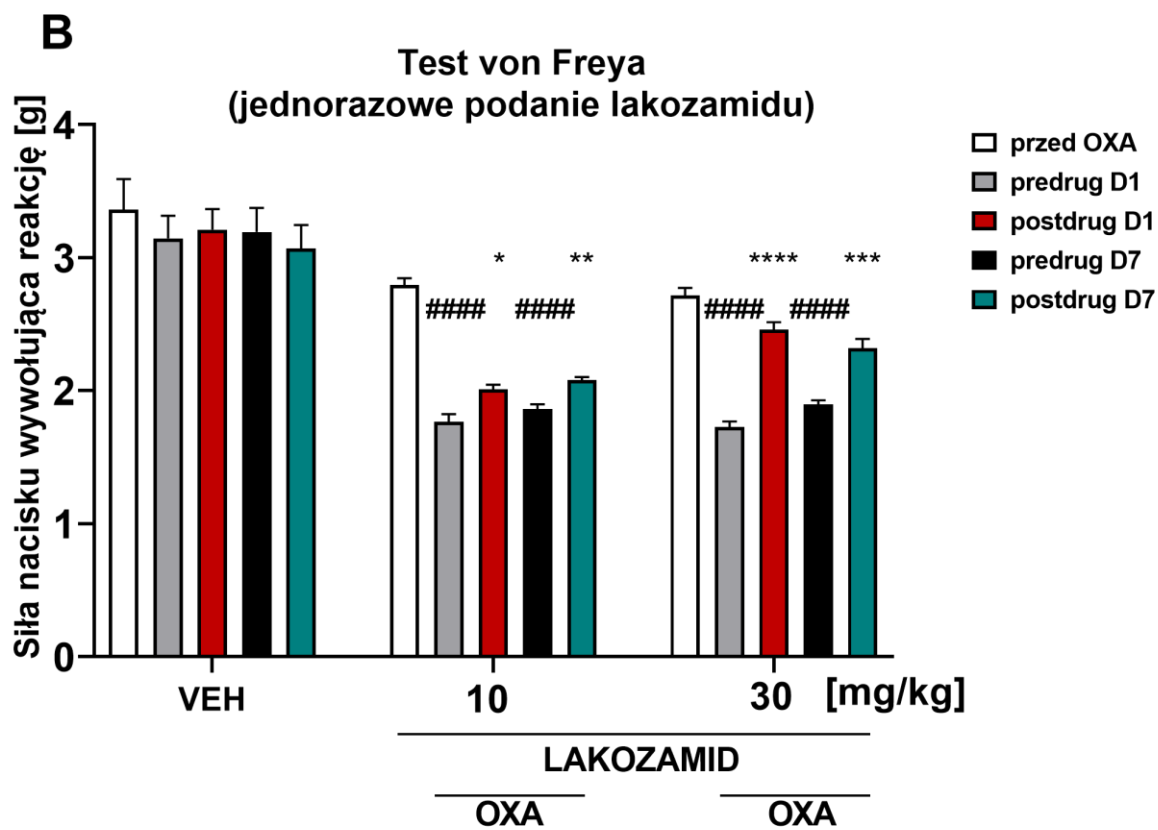
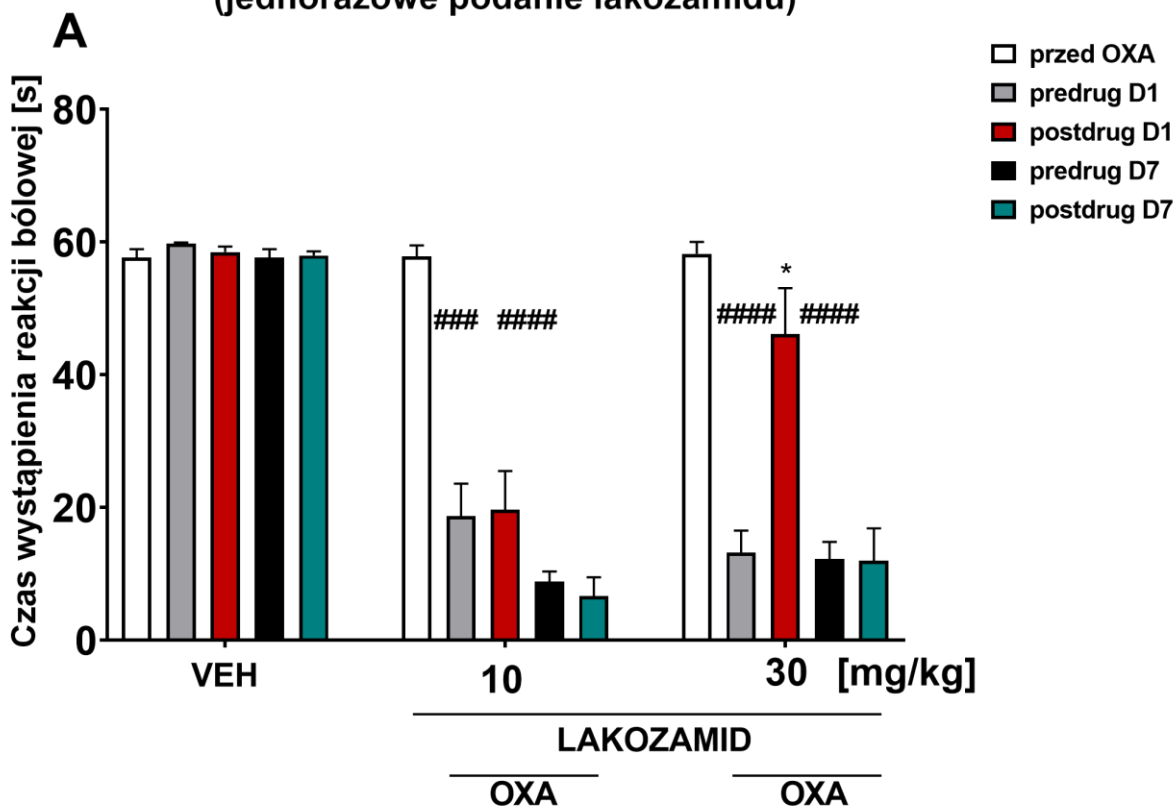
Podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie obniżenie progu bólowego zarówno w teście zimnej płytki i teście von Freya pierwszego i siódmego dnia eksperymentu ($P<0.0001$, oprócz pomiaru pierwszego dnia w teście zimnej płytki grupy otrzymującej lakozamid w dawce 10 mg/kg: $P<0.001$, Rycina 19).

W teście zimnej płytki skuteczność w łagodzeniu objawów nadwrażliwości termicznej wykazał lakozamid w dawce 30 mg/kg wyłącznie pierwszego dnia eksperymentu ($P<0.05$, Rycina 19A). W teście von Freya lakozamid w dawce 10 mg/kg wykazał istotną statystycznie aktywność przeciwbólową, podwyższając próg bólowy pierwszego ($P<0.05$, Rycina 19B) i siódmego ($P<0.01$, Rycina 19B) dnia eksperymentu. Dawka 30 mg/kg wykazała zauważalnie silniejszy efekt przeciwbólowy w pierwszym ($P<0.0001$, Rycina 19B) i siódmym ($P<0.001$, Rycina 19B) dniu podania w porównaniu do dawki 10 mg/kg.

Rycina 19. Wpływ lakoamidu (10 i 30 mg/kg, i.p.) na próg bólowy zwierząt mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla n=7–10 (± SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ### P<0.001, #### P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję przed podaniem lakoamidu w odpowiednim punkcie czasowym: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001. OXA – oksaliplatyna, predrug – pomiar przed podaniem lakoamidu, postdrug – pomiar po podaniu lakoamidu, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu. Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.

Test zimnej płytki
(jednorazowe podanie lako zamidu)

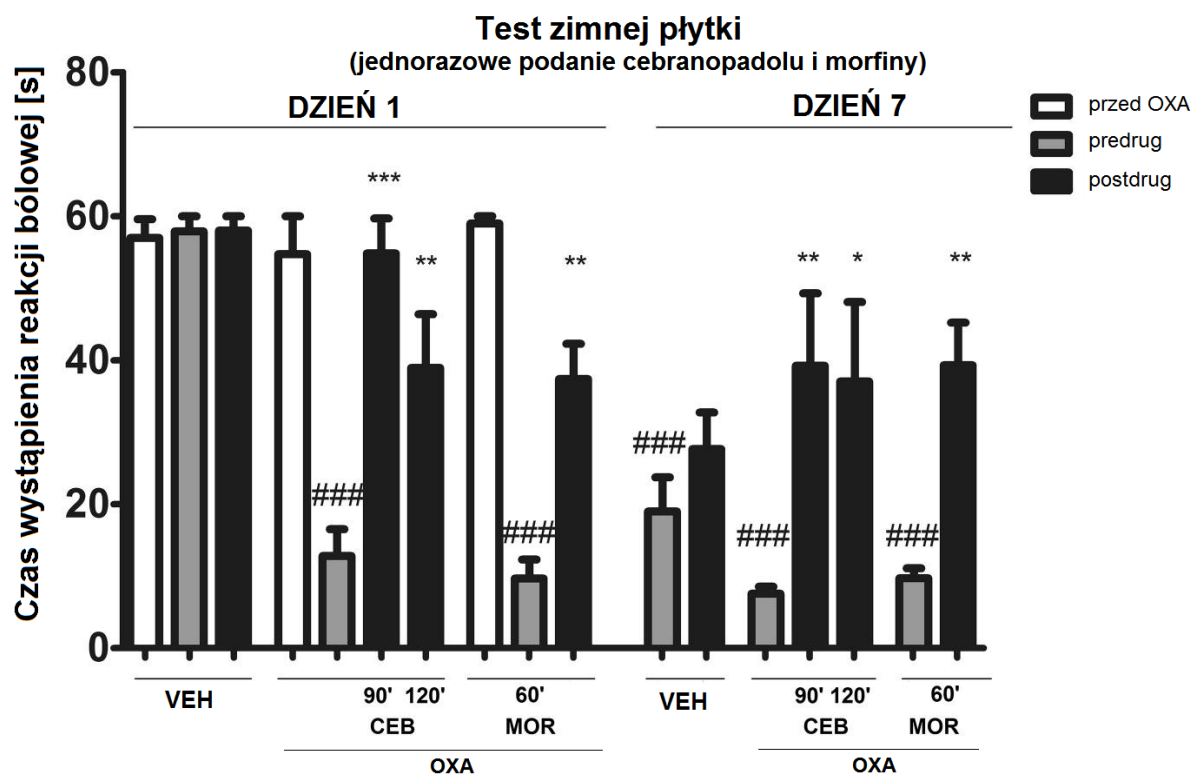


4.2.5 Badanie oceniające skuteczność cebranopadolu i morfiny

Ponieważ w rekomendacjach leczenia bólu neuropatycznego jedną z możliwych terapii jest wykorzystanie opioidowych leków przeciwbólowych [152], w przedstawionym eksperymencie oceniono skuteczność analgetyczną cebranopadolu – nowego agonisty receptorów nocycetyliny/orfaniny FQ oraz wszystkich klasycznych receptorów opioidowych – κ , μ , δ [302]. We wcześniejszych badaniach cebranopadol wykazał skuteczność w różnych zwierzęcych modelach bólu neuropatycznego [303] i bólu trzewnego [304], przy mniejszej tendencji do wywoływania uzależnienia fizycznego, w porównaniu do klasycznych leków opioidowych [305]. W modelu CIPN, skuteczność cebranopadolu nie została oceniona w żadnym z wcześniejszych badań, z tego względu postanowiono zbadać wpływ tego związku na zdolność łagodzenia objawów CIPN indukowanej oksaliplatyną. W niniejszym badaniu jako związek odniesienia wykorzystano morfinę.

Jednoczynnikowa analiza wariancji wykazała efekt „badanego związku” ($F_{16,127} = 15.58$, $P < 0.0001$). Pierwszego dnia eksperymentu zarówno cebranopadol, jak i morfina wykazały silne i istotne statystycznie działanie przeciwbólowe. Skuteczność cebranopadolu była oceniana w dwóch przedziałach czasowych po 90 i 120 min od podania, morfiny po 60 min od wstrzyknięcia. W obu punktach czasowych cebranopadol wykazał istotną statystycznie aktywność ($P < 0.001$ po 90 min i $P < 0.01$ po 120 min, Rycina 20). Morfina również łagodziła nadwrażliwość termiczną indukowaną oksaliplatyną pierwszego dnia eksperymentu ($P < 0.01$, Rycina 20). Po siedmiu dniach od podania cytostatyka zarówno cebranopadol ($P < 0.01$ po 90 min i $P < 0.05$ po 120 min, Rycina 20), jak i morfina ($P < 0.01$, Rycina 20) wykazały istotne statystycznie działanie przeciwbólowe.

Wyniki niniejszego eksperymentu opublikowano w pracy: Sałat, K., Furgała, A., & Sałat, R. (2018). Evaluation of cebranopadol, a dually acting nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor agonist in mouse models of acute, tonic, and chemotherapy-induced neuropathic pain. *Inflammopharmacology*, 26(2), 361-374.



Rycina 20. Wpływ cebranopadolu (10 mg/kg, s.c.) i morfiny (10 mg/kg, s.c.) na próg bólowy zwierząt mierzony w teście zimnej płytki.

Nadwrażliwość termiczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej (\pm SEM) w odpowiedzi na stymulację termiczną (temperatura 2.5 °C) dla n=8–10. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa analiza wariancji i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar grupy kontrolnej nieotrzymującej oksaliplatyny: ### P<0.001; znamienność statystyczna vs. czas wystąpienia reakcji przed podaniem cebranopadolu i morfiny w odpowiednim punkcie czasowym: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001. OXA – oksaliplatyna, CEB – cebranopadol, MOR – morfina, przedrug – pomiar przed podaniem badanego związku, postdrug – pomiar po podaniu badanego związku. Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.

4.2.6 Badanie oceniające skuteczność ambroksolu

4.2.6.1 Podanie dożylnie ambroksolu

Ambroksol jest powszechnie stosowanym lekiem wykrztuśnym rekomendowanym w leczeniu różnego rodzaju schorzeń układu oddechowego. Od niedawna wiadomo, że oprócz działania mukolitycznego, ambroksol wykazuje również zdolność hamowania VGSCs [306], wpływa na transmisję serotonergiczną poprzez hamowanie wychwytu zwrotnego 5-HT oraz działa antagonistycznie na receptory 5-HT₃ [307].

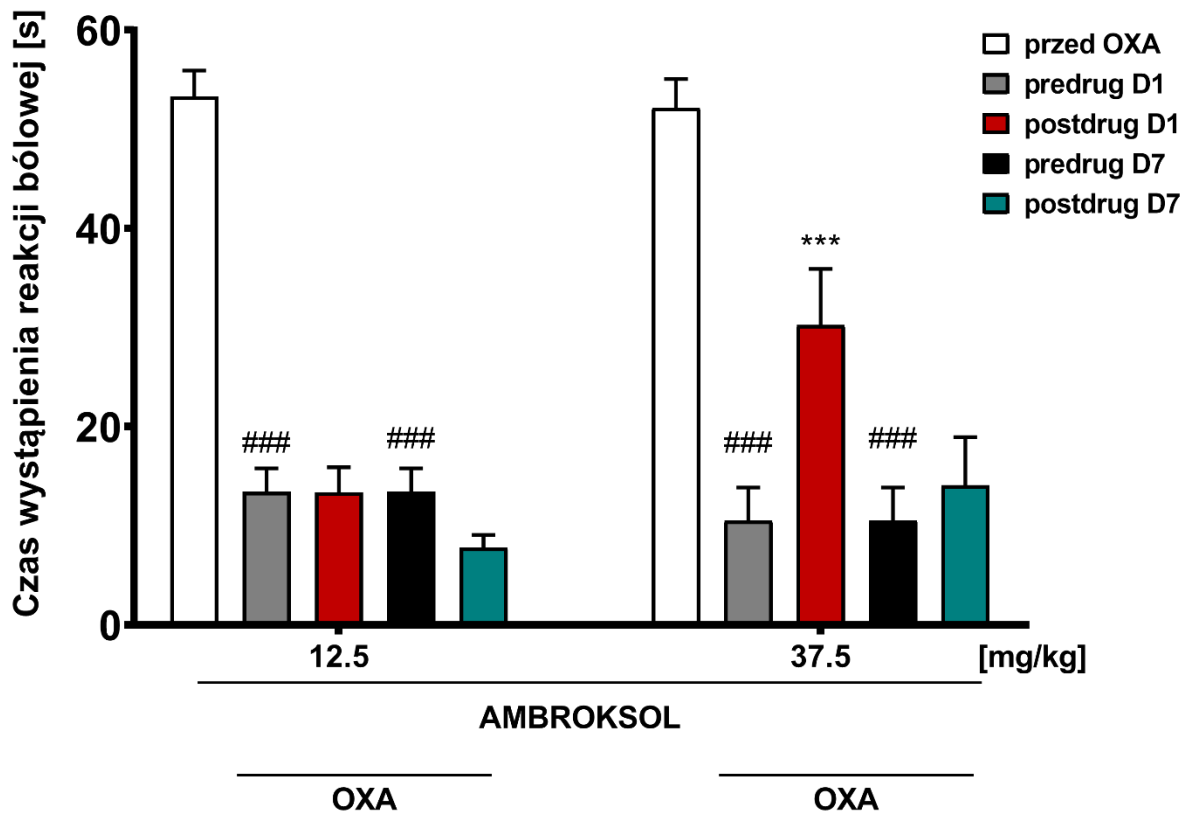
We wstępnym etapie badań została wyznaczona dawka aktywna i podprogowa dla ambroksolu podawanego drogą dożylną w teście zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{3,36}=1.794$, $P>0.05$; *efekt „czasu”* $F_{4,144}=97.30$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{12,144}=3.72$, $P<0.0001$.

Podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie obniżenie progu bólowego zarówno pierwszego, jak i siódmego dnia eksperymentu w obu grupach otrzymujących ambroksol ($P<0.001$, Rycina 21).

W teście zimnej płytki podanie dożylnie ambroksolu w dawce 12.5 mg/kg nie wywołało istotnego statystycznie wydłużenia czasu wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na działający bodziec termiczny (niską temperaturę) zarówno pierwszego, jak i siódmego dnia eksperymentu. Skuteczną dawką okazała się dawka 37.5 mg/kg, której podanie znamienne wydłużało czas wystąpienia reakcji bólowej pierwszego dnia eksperymentu ($P<0.001$, Rycina 21). Takiej aktywności nie wykazano w siódmym dniu eksperymentu. Uzyskane wyniki wykorzystano w kolejnych etapach badań.

Wyniki niniejszego eksperymentu opublikowano w pracy: Furgała, A., Fijałkowski, Ł., Nowaczyk, A., Sałat, R., & Sałat, K. (2018). Time-shifted co-administration of sub-analgesic doses of ambroxol and pregabalin attenuates oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 930-940.

Test zimnej płytki (jednorazowe podanie ambroksolu)



Rycina 21. Wpływ ambroksolu (12.5 i 37.5 mg/kg, *i.v.*) na próg bólowy zwierząt mierzony w teście zimnej płytki.

Nadwrażliwość termiczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej (\pm SEM) w odpowiedzi na stymulację termiczną (temperatura 2.5 °C) dla $n = 10$. Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami i test *post hoc* Bonferroniego. Znamiennosc statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ### $P < 0.001$; znamiennosc statystyczna vs. pomiar przed podaniem ambroksolu w odpowiednim punkcie czasowym: *** $P < 0.001$. OXA – oksaliplatyna, predrug – pomiar przed podaniem ambroksolu, postdrug – pomiar po podaniu ambroksolu, D1 – pierwszy dzien eksperymentu, D7 – siódmy dzien eksperymentu.

4.2.6.2 Podanie jednorazowe i wielokrotne ambroksolu

W kolejnym etapie badań sprawdzono, czy ambroksol podany drogą dootrzewnową wykazuje wpływ na próg bólowy u zwierząt poddanych działaniu oksaliplatyny.

Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{8,76}=11.12$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3,151,238.7}=122.0$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{32,303}=2.714$, $P<0.0001$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{8,81}=28.38$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{2,799,226.8}=232.0$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{32,324}=21.49$, $P<0.0001$.

W teście zimnej płytki podanie oksaliplatyny wywołało znamienne skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej pierwszego dnia eksperymentu ($P<0.001$, Rycina 22A) oraz po siedmiu dniach od podania cytostatyka ($P<0.05$, Rycina 22A). Nie zaobserwowano istotnej statystycznie aktywności przeciwbólowej ambroksolu w teście zimnej płytki w żadnym z zastosowanych schematów podań i dawek. Jednakże, podanie ambroksolu w dawce 150 mg/kg wykazywało tendencję do wydłużania czasu wystąpienia reakcji bólowej otrzymanych w pierwszym dniu eksperymentu (Rycina 22A).

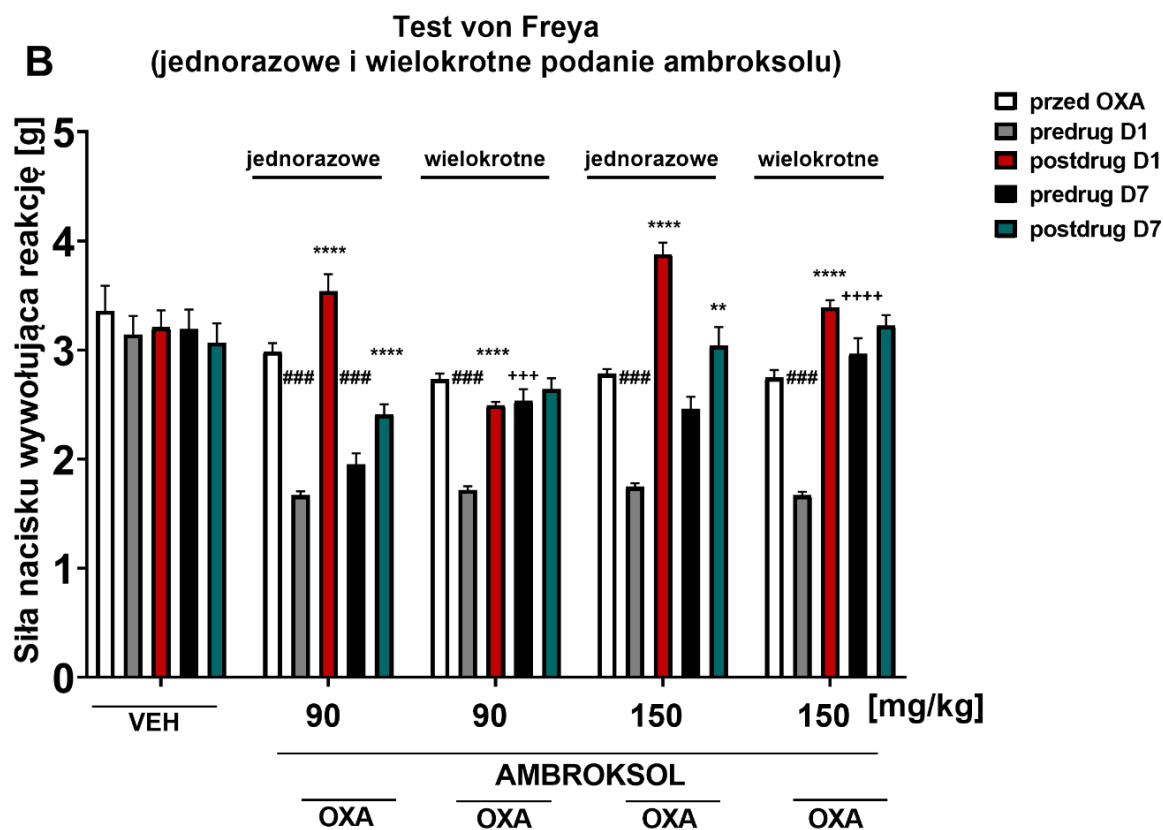
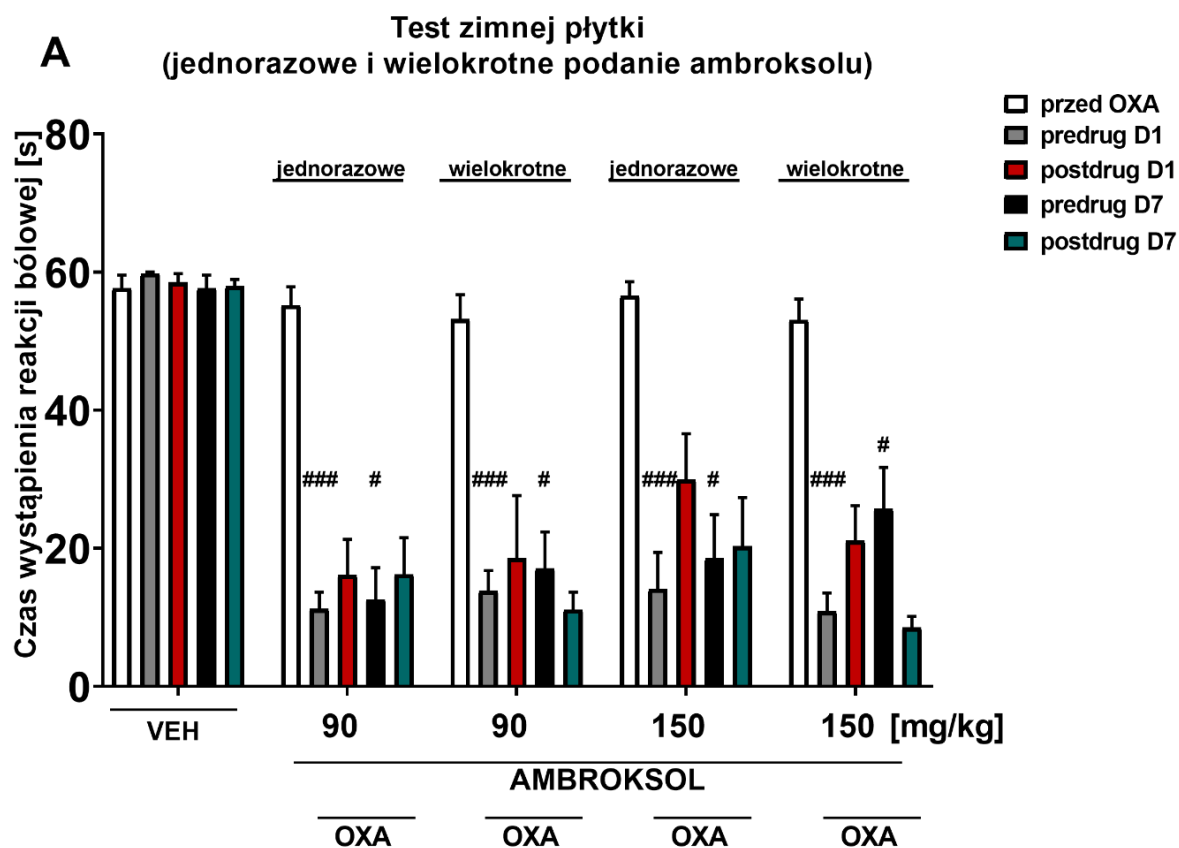
W teście von Freya podanie oksaliplatyny znamienne obniżało próg bólowy w odpowiedzi na działanie bodźca mechanicznego w pierwszym dniu eksperymentu we wszystkich grupach eksperymentalnych ($P<0.001$, Rycina 22B). Siódmego dnia taki efekt zaobserwowano wyłącznie w grupie otrzymującej jednorazowo ambroksol w dawce 90 mg/kg ($P<0.001$, Rycina 22B). Podanie ambroksolu wielokrotnie w dawce 90 mg/kg oraz jednorazowo i wielokrotnie w dawce 150 mg/kg hamowało rozwój nadwrażliwości mechanicznej po siedmiu dniach od podania cytostatyka, wykazując efekt ochronny.

Wpływ na nadwrażliwość mechaniczną w pierwszym dniu eksperymentu wykazał ambroksol we wszystkich zastosowanych dawkach ($P<0.0001$, Rycina 22B). Efekt ten był silny i przewyższał wartości pomiarów otrzymanych dla zwierząt, które nie otrzymały oksaliplatyny. Istotną statystycznie aktywność przeciwbólową w siódmym dniu eksperymentu zaobserwowano wyłącznie w grupach otrzymujących ambroksol jednorazowo (w dawce 90 mg/kg: $P<0.0001$; w dawce 150 mg/kg: $P<0.01$, Rycina 22B). Brak efektu w grupach otrzymujących ambroksol wielokrotnie wynika prawdopodobnie z wpływu ochronnego tego leku na rozwój późnej nadwrażliwości (po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny). W porównaniu do pomiaru po podaniu oksaliplatyny wykonanego w pierwszym dniu badania, pomiar wykonany dnia siódmego był znamienne wyższy w grupie otrzymującej wielokrotnie ambroksol w dawkach 90 mg/kg ($P<0.001$, Rycina 22B) i 150 mg/kg ($P<0.0001$, Rycina 22B).

Wyniki niniejszego eksperymentu opublikowano w pracy: Furgała-Wojas, A., Kowalska, M., Nowaczyk, A., Fijałkowski, Ł., & Sałat, K. (2020). Comparison of bromhexine and its active metabolite-ambroxol as potential analgesics reducing oxaliplatin-induced neuropathic pain-pharmacodynamic and molecular docking studies. *Current Drug Metabolism*, 21(7), 548-561.

Rycina 22. Wpływ ambroksolu (90 i 150 mg/kg, *i.p.*) podawanego jednorazowo i wielokrotnie na próg bólowy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla $n=10$ (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję myszy kontrolnych: # $P<0.05$, ### $P<0.001$; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję przed podaniem ambroksolu w odpowiednim punkcie czasowym: ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$; znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem ambroksolu pierwszego dnia eksperymentu: +++ $P<0.001$, ++++ $P<0.0001$. OXA – oksaliplatyna, predrug – pomiar przed podaniem ambroksolu, postdruż – pomiar po podaniu ambroksolu, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu. Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.



4.2.6.3 Ocena działania profilaktycznego ambroksolu

Z uwagi na wykazane w poprzednim badaniu (Rozdział 4.2.6.2) możliwe działanie ochronne ambroksolu podawanego wielokrotnie, hamujące rozwój CIPN, przeprowadzono doświadczenie oceniające czy lek ten podawany profilaktycznie jednorazowo i wielokrotnie w dawkach 90 i 150 mg/kg może hamować rozwój CIPN u myszy poddanych działaniu oksaliplatyny.

Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami*; podanie jednorazowe: efekt „badanego związku” $F_{4,40}=17.62$, $P<0.0001$; efekt „czasu” $F_{3,060,122.4}=47.64$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{16,160}=4.494$, $P<0.0001$; podanie wielokrotne: efekt „badanego związku” $F_{4,40}=10.21$, $P<0.0001$; efekt „czasu” $F_{4,138,165.5}=35.65$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{20,200}=3.064$, $P<0.0001$.

Test von Freya: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami*; podanie jednorazowe: efekt „badanego związku” $F_{4,45}=14.71$, $P<0.0001$; efekt „czasu” $F_{3,145,141.5}=24.61$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{16,180}=12.03$, $P<0.0001$; podanie wielokrotne: efekt „badanego związku” $F_{4,45}=16.43$, $P<0.0001$; efekt „czasu” $F_{3,921,176.4}=112.6$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{20,225}=3.544$, $P<0.0001$.

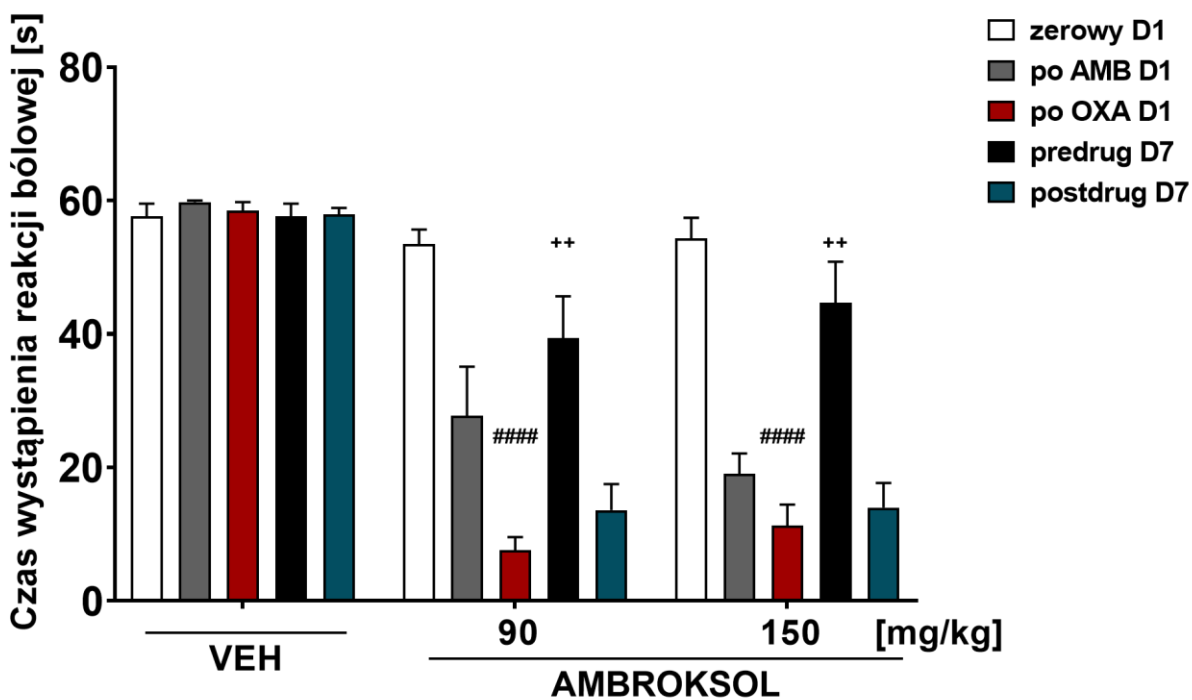
W teście zimnej płytki podanie jednorazowe ambroksolu przed oksaliplatyną nie wykazało działania ochronnego. Pomiary wykonane po podaniu cytostatyka były znamienne niższe w porównaniu do pomiarów wykonanych jako pomiar zerowy przed podaniem oksaliplatyny i badanego leku ($P<0.0001$, Rycina 23A). Jednakże pomiar zerowy wykonany siódmego dnia eksperymentu był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do pomiaru po oksaliplatynie z pierwszego dnia eksperymentu w grupie otrzymującej ambroksol w dawkach 90 i 150 mg/kg ($P<0.01$, Rycina 23A).

W teście von Freya podanie oksaliplatyny indukowało rozwój nadwrażliwości mechanicznej zarówno w grupie otrzymującej ambroksol w dawkach 90 mg/kg ($P<0.0001$, Rycina 23B) i 150 mg/kg ($P<0.01$, Rycina 23B) w pierwszym dniu eksperymentu. Pomiar zerowy wykonany siódmego dnia w grupie otrzymującej ambroksol w dawce 90 mg/kg był znamienne niższy ($P<0.05$, Rycina 23B), a dodatkowe podanie ambroksolu potęgowało efekt łagodzący objawy nadwrażliwości mechanicznej ($P<0.05$, Rycina 23B). Jednorazowe podanie ambroksolu w dawce 150 mg/kg wykazywało efekt ochronny na rozwój nadwrażliwości po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny, podwyższając pomiar siły nacisku wywołującej reakcję do poziomu grupy kontrolnej, która nie otrzymała cytostatyka.

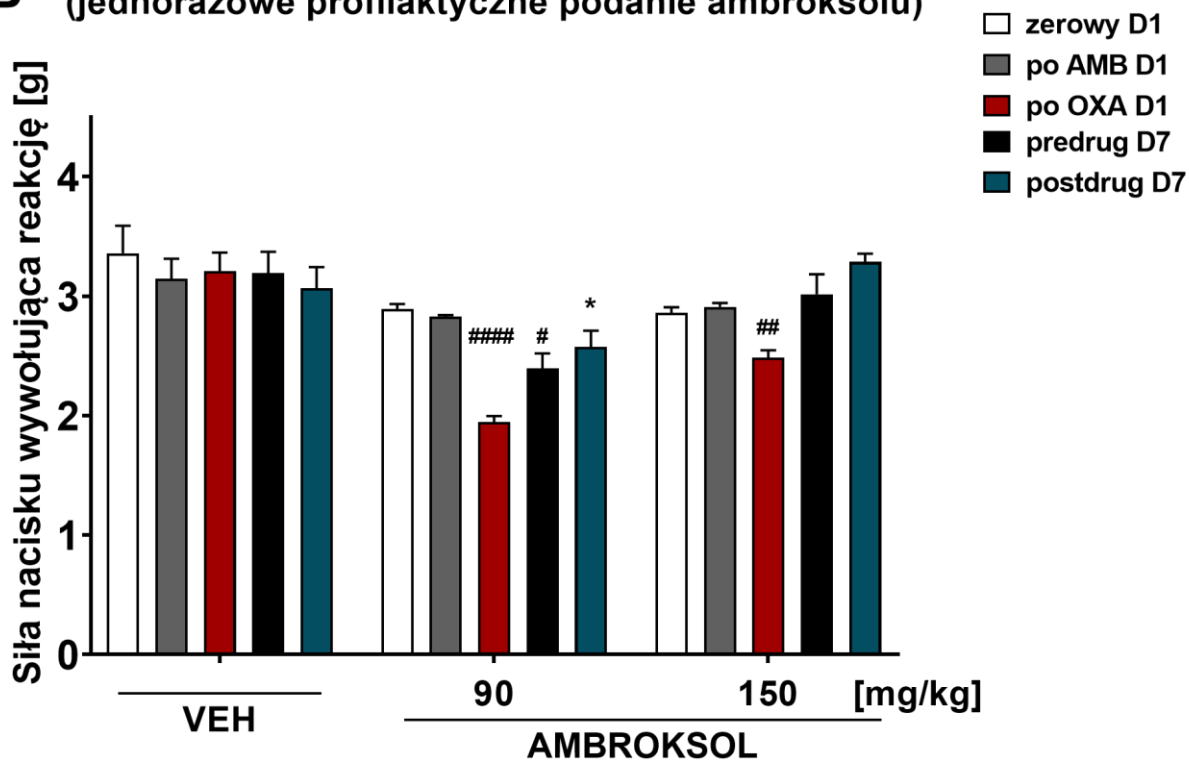
Rycina 23. Wpływ ambroksolu (90 i 150 mg/kg, i.p.) podawanego jednorazowo profilaktycznie na próg bólowy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla n=5–10 (± SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję bólową myszy, przed podaniem oksaliplatyny i ambroksolu: # P<0.05, ## P<0.01, ##### P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję po podaniu oksaliplatyny: ++ P<0.01; znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem ambroksolu: * P<0.05. OXA – oksaliplatyna, AMB – ambroksol, predrug – pomiar przed podaniem ambroksolu, postdrug – pomiar po podaniu ambroksolu, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu. Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.

A Test zimnej płytki
(jedenorazowe profilaktyczne podanie ambroksolu)



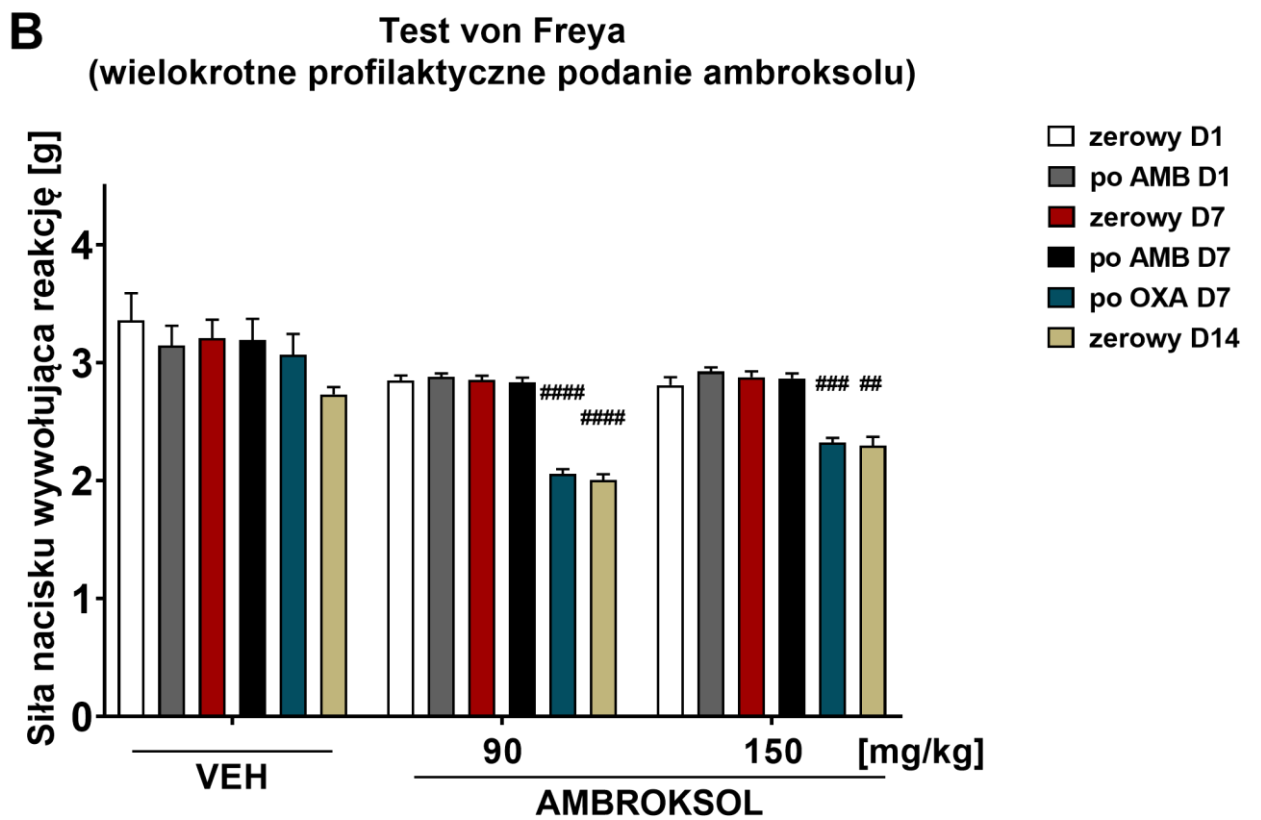
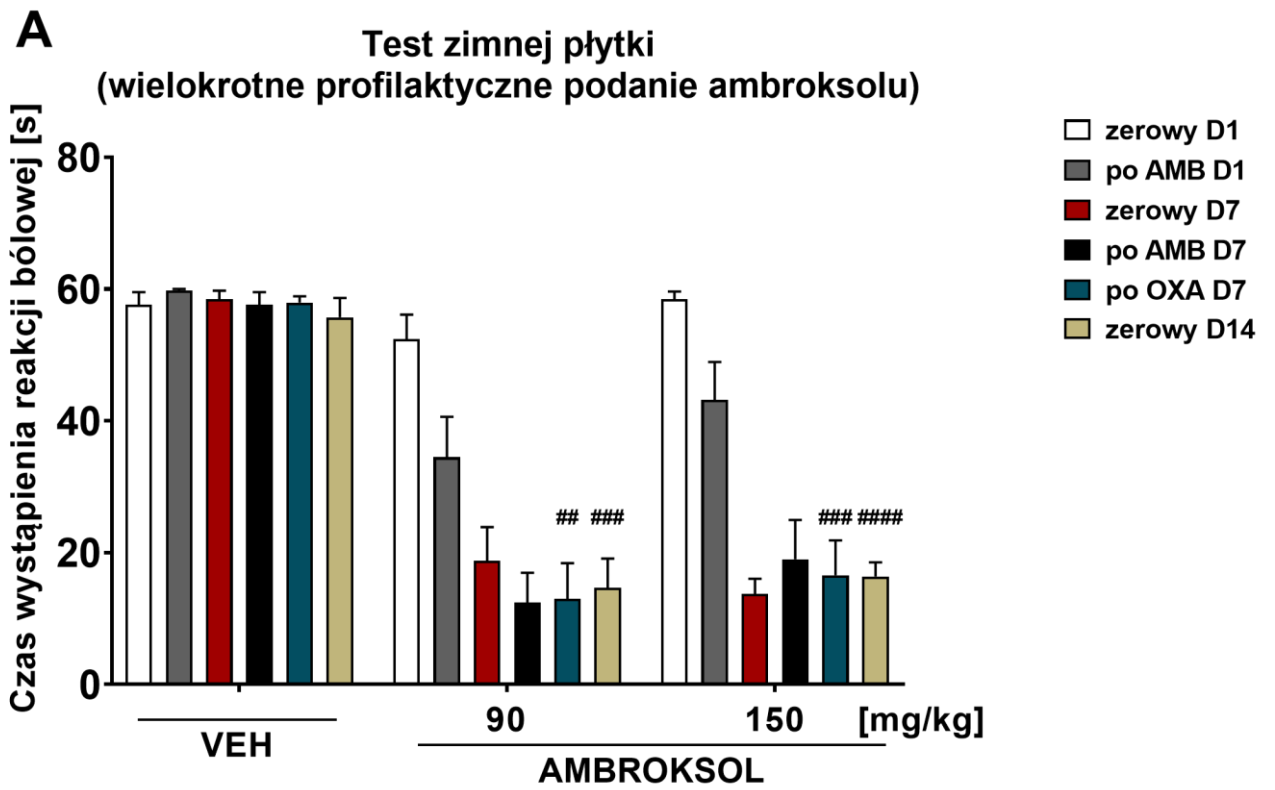
B Test von Freya
(jedenorazowe profilaktyczne podanie ambroksolu)



W schemacie profilaktyki wielokrotnej w teście zimnej płytki, podanie ambroksolu przez siedem dni przed podaniem oksaliplatyny nie wykazało efektu ochronnego na rozwój nadwrażliwości termicznej. Pomiar wykonany po podaniu cytostatyka pierwszego dnia był istotnie statystycznie niższy w grupie otrzymującej ambroksol w dawkach 90 mg/kg ($P < 0.01$, Rycina 24A) i 150 mg/kg ($P < 0.001$, Rycina 24A) i dodatkowo utrzymał się siedem dni po podaniu oksaliplatyny (ambroksol w dawce 90 mg/kg, $P < 0.001$; ambroksol w dawce 150 mg/kg, $P < 0.0001$, Rycina 24A). Podobny efekt zaobserwowano w teście von Freya. Zarówno podanie ambroksolu w dawce 90 mg/kg ($P < 0.0001$, Rycina 24B) i 150 mg/kg ($P < 0.001$, pierwszy dzień po podaniu oksaliplatyny; $P < 0.01$, siódmy dzień od podania oksaliplatyny, Rycina 24B) nie chroniło przed rozwojem nadwrażliwości mechanicznej pierwszego i siódmego dnia po podaniu cytostatyka.

Rycina 24. Wpływ ambroksolu (90 i 150 mg/kg, i.p.) podawanego wielokrotnie profilaktycznie na próg bólowy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano pierwszego dnia podania ambroksolu (D1), w dniu podania oksaliplatyny (D7) oraz w 7 dni po podaniu cytostatyka (D14). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla $n=5-10$ (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję bólową myszy, przed podaniem oksaliplatyny i ambroksolu: ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, ##### $P<0.0001$. OXA – oksaliplatyna, AMB – ambroksol, predrug – pomiar przed podaniem ambroksolu, postdrug – pomiar po podaniu ambroksolu, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu (dzień podania oksaliplatyny), D14 – czternasty dzień eksperymentu (siódmy od podania oksaliplatyny). Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.



4.2.7 Badanie oceniające skuteczność bromheksyny

4.2.7.1 Podanie jednorazowe i wielokrotne bromheksyny

Bromheksyna jest lekiem mukolitycznym, dla którego ambroksol stanowi aktywny metabolit. W organizmie bromheksyna ulega metabolizmowi do dwóch głównych metabolitów: ambroksolu i związku E-3-HDMB ((E)-3-hydroksydemetylobromheksyny) oraz w mniejszym stopniu do innych związków [308]. Pomimo że ambroksol jest głównym aktywnym metabolitem bromheksyny, profil działania analgetycznego obu leków może być różny. W przypadku bromheksyny może on wynikać z aktywności innych metabolitów oraz zdolności oddziaływania z receptorami sigma [309,310]. Z uwagi na powyższe, postanowiono zweryfikować hipotezę, czy bromheksyna podawana w sposób analogiczny jak ambroksol, wykaże zbliżony profil działania analgetycznego w modelu CIPN.

Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{8,76}=11.12$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3,151,238.7}=122.0$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{32,303}=2.714$, $P<0.0001$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{8,81}=28.38$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{2,799,226.8}=232.0$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{32,324}=21.49$, $P<0.0001$.

W teście zimnej płytki podanie oksaliplatyny wywołało znamienne skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej pierwszego dnia eksperymentu ($P<0.001$, Rycina 25A) oraz po siedmiu dniach od podania cytostatyka ($P<0.05$, Rycina 25A), z wyjątkiem wielokrotnie podawanej bromheksyny w dawce 150 mg/kg. W tej grupie pomiar przed podaniem leku w siódmym dniu eksperymentu był znamienne wyższy w stosunku do pomiaru po oksaliplatynie z pierwszego dnia pomiarów ($P<0.05$, Rycina 25A). Świadczy to o ochronnym wpływie podania wielokrotnego bromheksyny na rozwój nadwrażliwości termicznej po siedmiu dniach od podania cytostatyka. Podobny efekt, jednak słabszy i nieistotny statystycznie zauważalny był również w grupie otrzymującej wielokrotnie bromheksynę w dawce 90 mg/kg.

W teście von Freya istotnie statystycznie obniżenie progu siły nacisku wywołującej reakcję bólową po podaniu oksaliplatyny pierwszego dnia zaobserwowano we wszystkich grupach eksperymentalnych ($P<0.001$, Rycina 25B). Utrzymanie się tego efektu do siódmego dnia trwania eksperymentu było widoczne w grupie otrzymującej: jednorazowo bromheksynę w dawkach 90 i 150 mg/kg ($P<0.001$, Rycina 25B) oraz wielokrotnie bromheksynę w dawce 90 mg/kg ($P<0.05$, Rycina 25B). W grupach otrzymujących bromheksynę wielokrotnie zaobserwowano znamienne podwyższenie wartości pomiarów otrzymanych w siódmym dniu, w porównaniu do pomiarów po podaniu oksaliplatyny z pierwszego dnia eksperymentu, świadczące o efekcie ochronnym podania wielokrotnego bromheksyny w dawkach 90 mg/kg ($P<0.01$, Rycina 25B) i 150 mg/kg ($P<0.001$, Rycina 25B).

W pierwszym dniu eksperymentu podanie bromheksyny w dawce 90 mg/kg wykazało efekt przeciwbólowy w grupie otrzymującej ten lek wielokrotnie ($P<0.01$, Rycina 25B) oraz w dawce 150 mg/kg wykazało silny efekt przeciwbólowy i łagodziło objawy nadwrażliwości mechanicznej ($P<0.001$, podanie jednorazowe; $P<0.0001$, podanie wielokrotne, Rycina 25B).

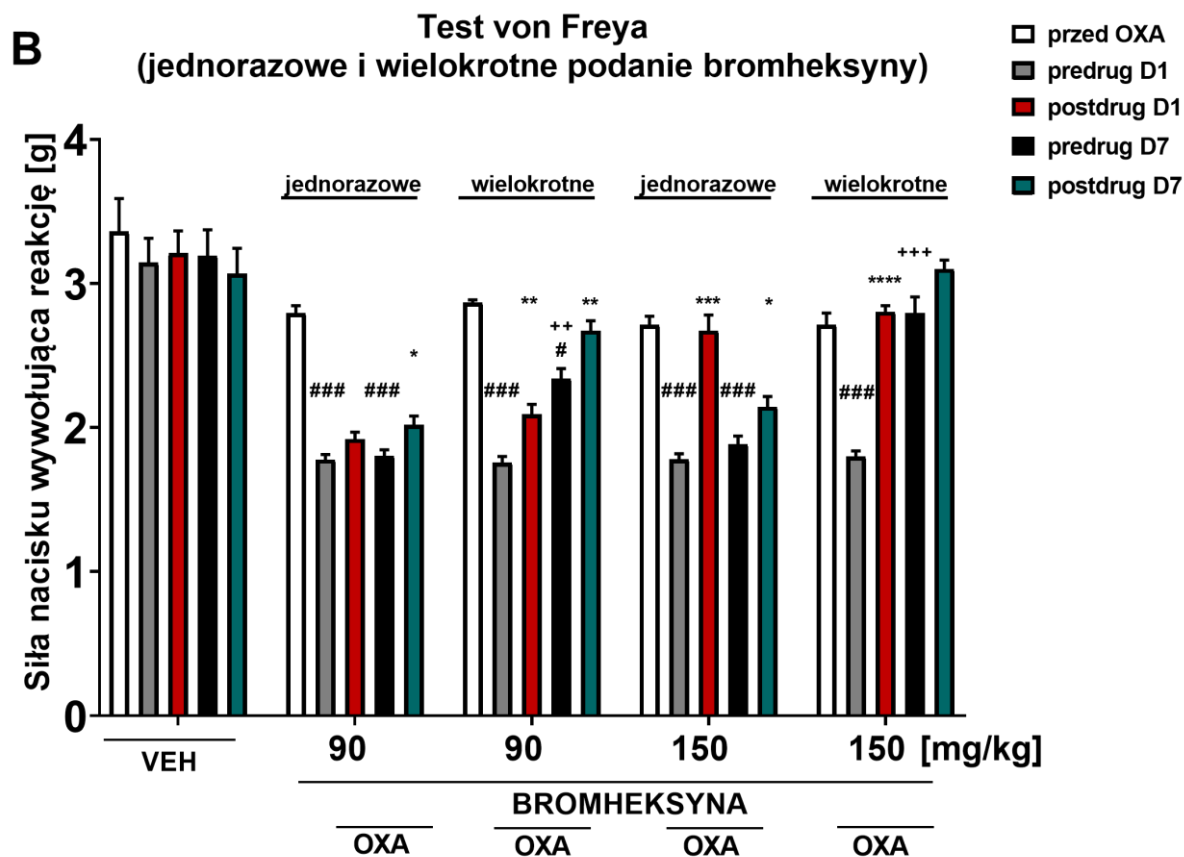
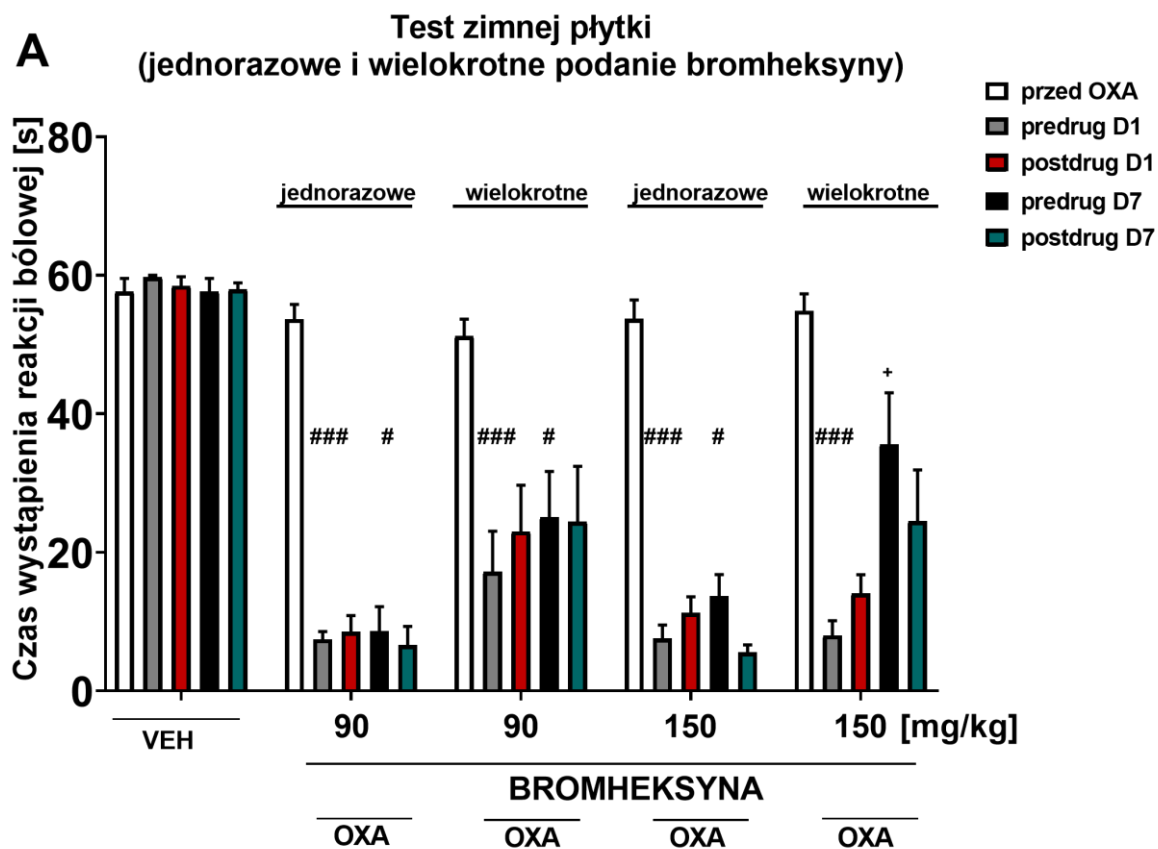
W siódmym dniu eksperymentu znamienne działanie przeciwbólowe wykazało podanie bromheksyny w dawkach 90 mg/kg ($P<0.05$, podanie jednorazowe; $P<0.01$, podanie wielokrotne, Rycina 25B) oraz 150 mg/kg w schemacie podania jednorazowego ($P<0.05$,

Rycina 25B). Brak znamienego efektu w grupie otrzymującej wielokrotnie bromheksynę w dawce 150 mg/kg wynikać może z silnego działania hamującego rozwój nadwrażliwości mechanicznej po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny, prowadzącego do otrzymania wartości pomiarów porównywalnych jak dla zwierząt, które nie otrzymały oksaliplatyny.

Wyniki niniejszego eksperymentu opublikowano w pracy: Furgała-Wojas, A., Kowalska, M., Nowaczyk, A., Fijałkowski, Ł., & Sałat, K. (2020). Comparison of bromhexine and its active metabolite-ambroxol as potential analgesics reducing oxaliplatin-induced neuropathic pain-pharmacodynamic and molecular docking studies. *Current Drug Metabolism*, 21(7), 548-561.

Rycina 25. Wpływ bromheksyny (90 i 150 mg/kg, i.p.) podawanej jednorazowo i wielokrotnie na próg bólowy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla $n=5-10$ (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję myszy kontrolnych: # $P<0.05$, ### $P<0.001$; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję przed podaniem bromheksyny w odpowiednim punkcie czasowym: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$; znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem bromheksyny pierwszego dnia eksperymentu: + $P<0.05$, ++ $P<0.01$, +++ $P<0.001$. OXA – oksaliplatyna, predrug – pomiar przed podaniem bromheksyny, postdrug – pomiar po podaniu bromheksyny, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu. Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.



4.2.7.2 Podanie profilaktyczne bromheksyny

Wykazane w poprzednim badaniu potencjalne działanie ochronne, szczególnie widoczne w schemacie podania wielokrotnego, skłoniło do zaplanowania dalszych, poszerzonych badań mających na celu ocenę wpływu podania profilaktycznego bromheksyny, na rozwój nadwrażliwości czuciowej, u myszy poddanych działaniu oksaliplatyny. W celu weryfikacji skuteczności działania ochronnego bromheksynę podawano jednorazowo i wielokrotnie w dawkach 90 i 150 mg/kg przed podaniem oksaliplatyny wykonując test zimnej płytki i test von Freya.

Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami*; podanie jednorazowe: efekt „badanego związku” $F_{4,40}=17.62$, $P<0.0001$; efekt „czasu” $F_{3,060,122.4}=47.64$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{16,160}=4.494$, $P<0.0001$; podanie wielokrotne: efekt „badanego związku” $F_{4,40}=10.21$, $P<0.0001$; efekt „czasu” $F_{4,138,165.5}=35.65$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{20,200}=3.064$, $P<0.0001$.

Test von Freya: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami*; podanie jednorazowe: efekt „badanego związku” $F_{4,45}=14.71$, $P<0.0001$; efekt „czasu” $F_{3,145,141.5}=24.61$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{16,180}=12.03$, $P<0.0001$; podanie wielokrotne: efekt „badanego związku” $F_{4,45}=16.43$, $P<0.0001$; efekt „czasu” $F_{3,921,176.4}=112.6$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{20,225}=3.544$, $P<0.0001$.

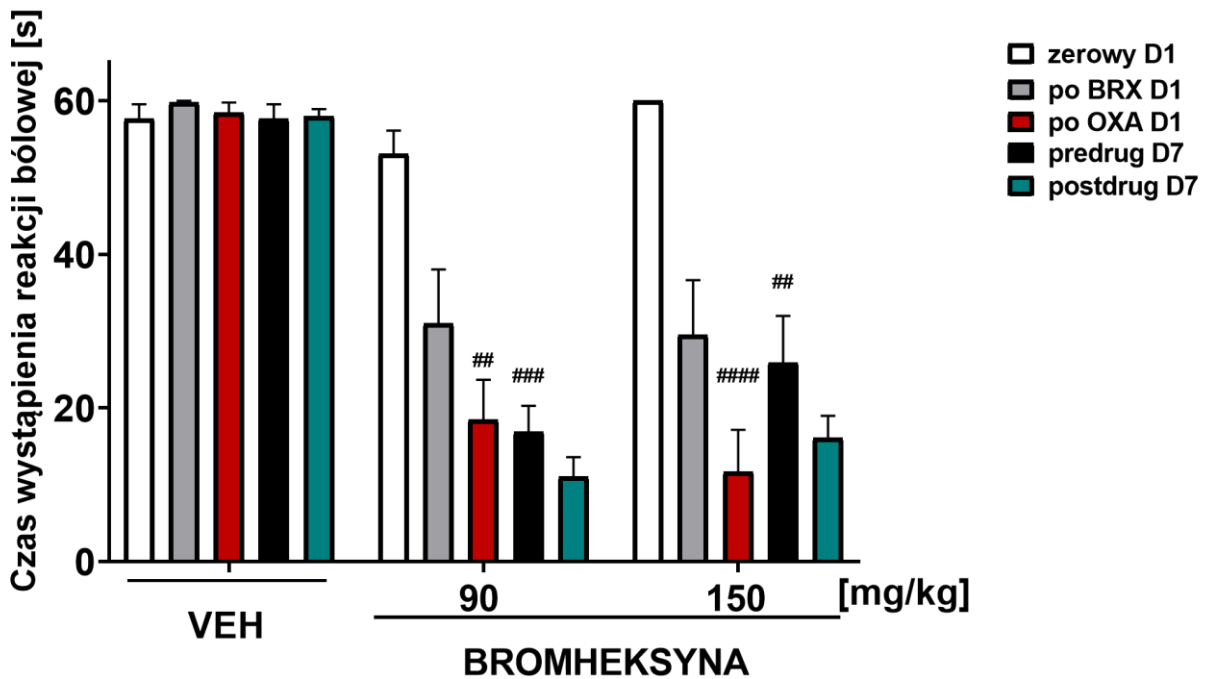
W teście zimnej płytki w schemacie profilaktyki jednorazowej podanie bromheksyny nie wpłynęło znacząco na wartość pomiarów uzyskanych po podaniu oksaliplatyny pierwszego dnia, zarówno w dawce 90 mg/kg ($P<0.01$, Rycina 26A), jak i 150 mg/kg ($P<0.0001$, Rycina 26A). Po siedmiu dniach od podania cytostatyka próg czucia bodźców termicznych był ciągle niski w grupie otrzymującej profilaktycznie bromheksynę w dawkach 90 mg/kg ($P<0.001$, Rycina 26A) i 150 mg/kg ($P<0.01$, Rycina 26A).

W teście von Freya w schemacie profilaktyki jednorazowej podanie bromheksyny w dawce 90 mg/kg przed podaniem oksaliplatyny nie wpłynęło ochronnie na rozwój nadwrażliwości mechanicznej ($P<0.01$, pierwszy dzień po podaniu oksaliplatyny; $P<0.0001$ siódmy dzień eksperymentu, Rycina 26B). Podanie bromheksyny w dawce 150 mg/kg przed podaniem oksaliplatyny wykazało działanie ochronne, hamując rozwój nadwrażliwości mechanicznej w pierwszym i siódmym dniu pomiarów, przy czym silniejszy efekt profilaktyczny obserwowany był w pierwszym dniu podania oksaliplatyny. Wartość siły nacisku wywołującej reakcję bólową po podaniu oksaliplatyny była zbliżona do pomiaru uzyskanego dla grupy kontrolnej zwierząt, które nie otrzymały cytostatyka. Ponadto, podanie bromheksyny w dawce 150 mg/kg w siódmym dniu eksperymentu istotnie statystycznie podwyższało wartość pomiaru siły nacisku i wykazało działanie przeciwbólowe ($P<0.001$, Rycina 26B).

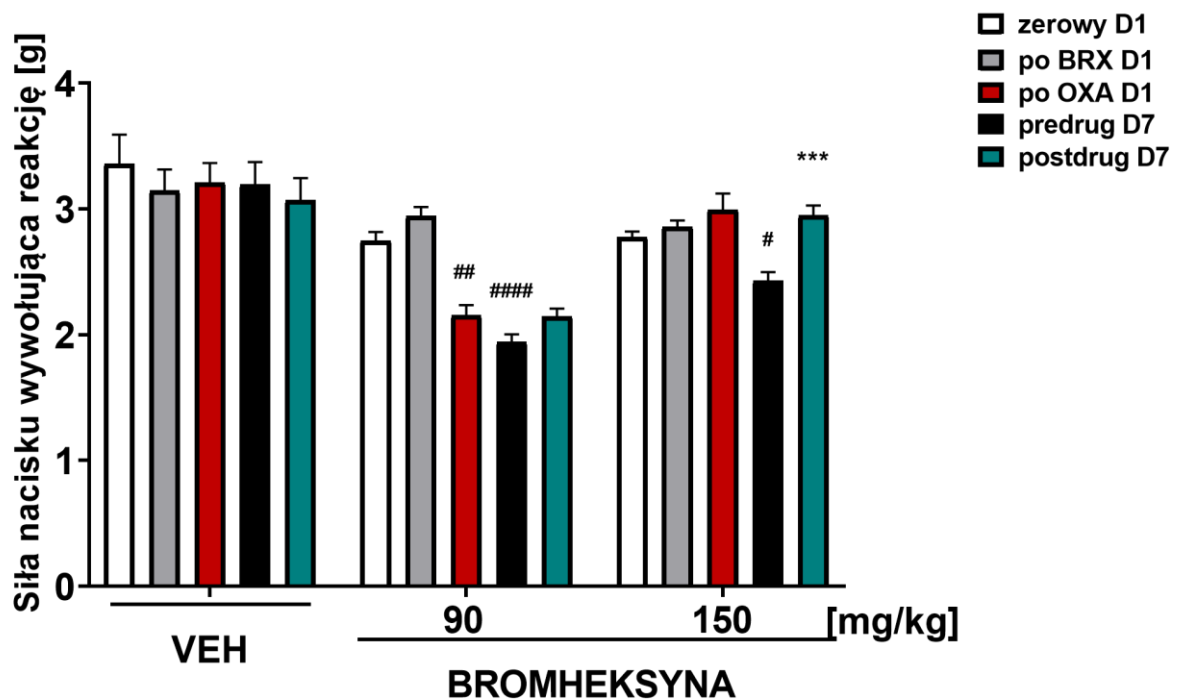
Rycina 26. Wpływ bromheksyny (90 i 150 mg/kg, i.p.) podawanej jednorazowo profilaktycznie na próg bólowy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla n=5–10 (± SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję myszy, przed podaniem oksaliplatyny i bromheksyny: # P<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001, #### P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem bromheksyny: *** P<0.001. OXA – oksaliplatyna, BRX – bromheksyna, predrug – pomiar przed podaniem bromheksyny, postdrug – pomiar po podaniu bromheksyny, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu. Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.

A Test zimnej płytki
(jednorazowe profilaktyczne podanie bromheksyny)



B Test von Freya
(jednorazowe profilaktyczne podanie bromheksyny)



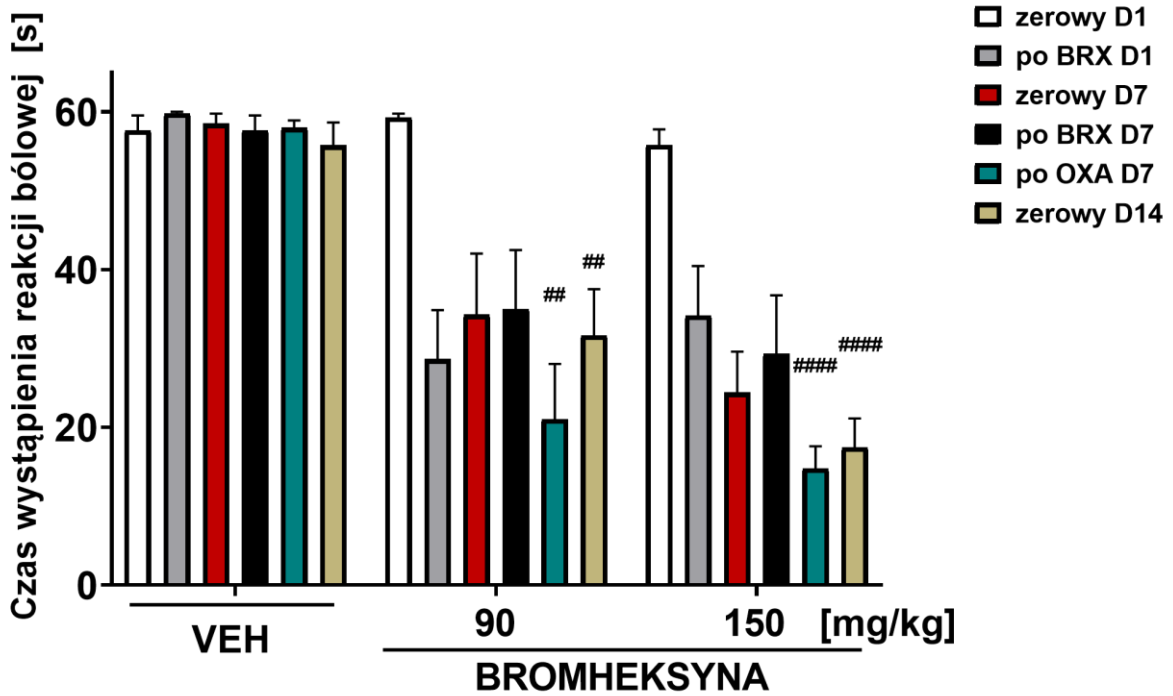
W schemacie prewencji wielokrotnej, w teście zimnej płytki i teście von Freya żadna z zastosowanych dawek bromheksyny podawanych przez siedem dni przed podaniem oksaliplatyny nie wykazała działania ochronnego na rozwój nadwrażliwości termicznej i mechanicznej w pierwszym i siódmym dniu po podaniu cytostatyka (test zimnej płytki: $P < 0.01$ dla bromheksyny w dawce 90 mg/kg D7 i D14; $P < 0.0001$ dla bromheksyny w dawce 150 mg/kg D7 i D14, Rycina 27A; test von Freya: $P < 0.0001$ dla bromheksyny w dawce 90 mg/kg D7 i D14; $P < 0.001$ – D7 i $P < 0.01$ – D14 dla bromheksyny w dawce 150 mg/kg, Rycina 27B).

Rycina 27. Wpływ bromheksyny (90 i 150 mg/kg, i.p.) podawanej wielokrotnie profilaktycznie na próg bólowy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano pierwszego dnia podania bromheksyny (D1), w dniu podania oksaliplatyny (D7) oraz w 7 dni po podaniu cytostatyka (D14). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla $n=5-10$ (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję myszy, przed podaniem oksaliplatyny i bromheksyny: ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, ##### $P<0.0001$. OXA – oksaliplatyna, BRX – bromheksyna, predrug – pomiar przed podaniem bromheksyny, postdrug – pomiar po podaniu bromheksyny, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu (dzień podania oksaliplatyny), D14 – czternasty dzień eksperymentu (siódmy od podania oksaliplatyny). Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.

Test zimnej płytki

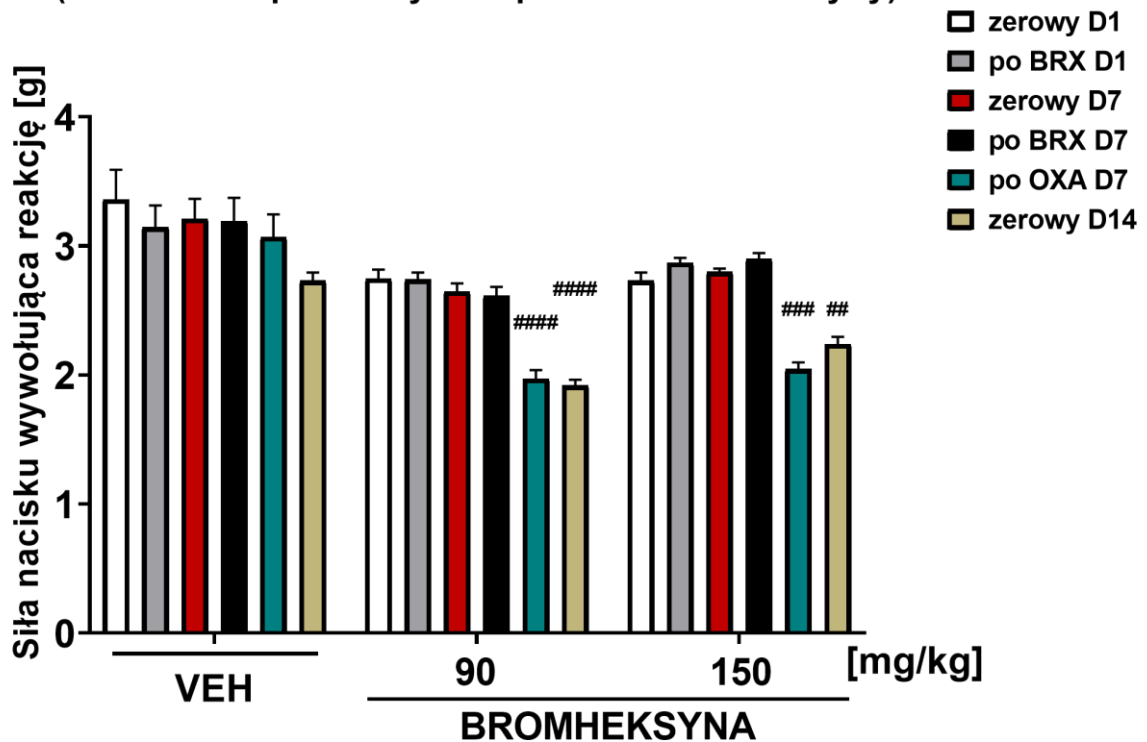
A (wielokrotne profilaktyczne podanie bromheksyny)



B

Test von Freya

(wielokrotne profilaktyczne podanie bromheksyny)



4.2.8 Badanie oceniające skuteczność aripiprazolu

Aripiprazol jest lekiem przeciwpsychotycznym, o udokumentowanej aktywności jako częściowy agonista receptorów dopaminergicznych D₂ i serotoninerpicznych 5-HT_{1A} oraz antagonistyczną wobec receptorów 5-HT_{2A} [285]. Dane literaturowe wskazują, że lek ten wykazuje również aktywność przeciwbólową, w niektórych przypadkach opornego na leczenie bólu przewlekłego [311,312]. Jego aktywność przeciwbólowa w CIPN nie została do tej pory oceniona. Ze względu na połączenie aktywności dopaminergicznej z komponentą serotoninerpiczną, aripiprazol może być ciekawą opcją leczenia i łagodzenia objawów CIPN.

Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{14,131}=1.574$, $P>0.05$; *efekt „czasu”* $F_{4,524}=243.1$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{56,524}=2.006$, $P<0.0001$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{10,95}=14.03$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{4,380}=339.4$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{40,380}=7.843$, $P<0.0001$.

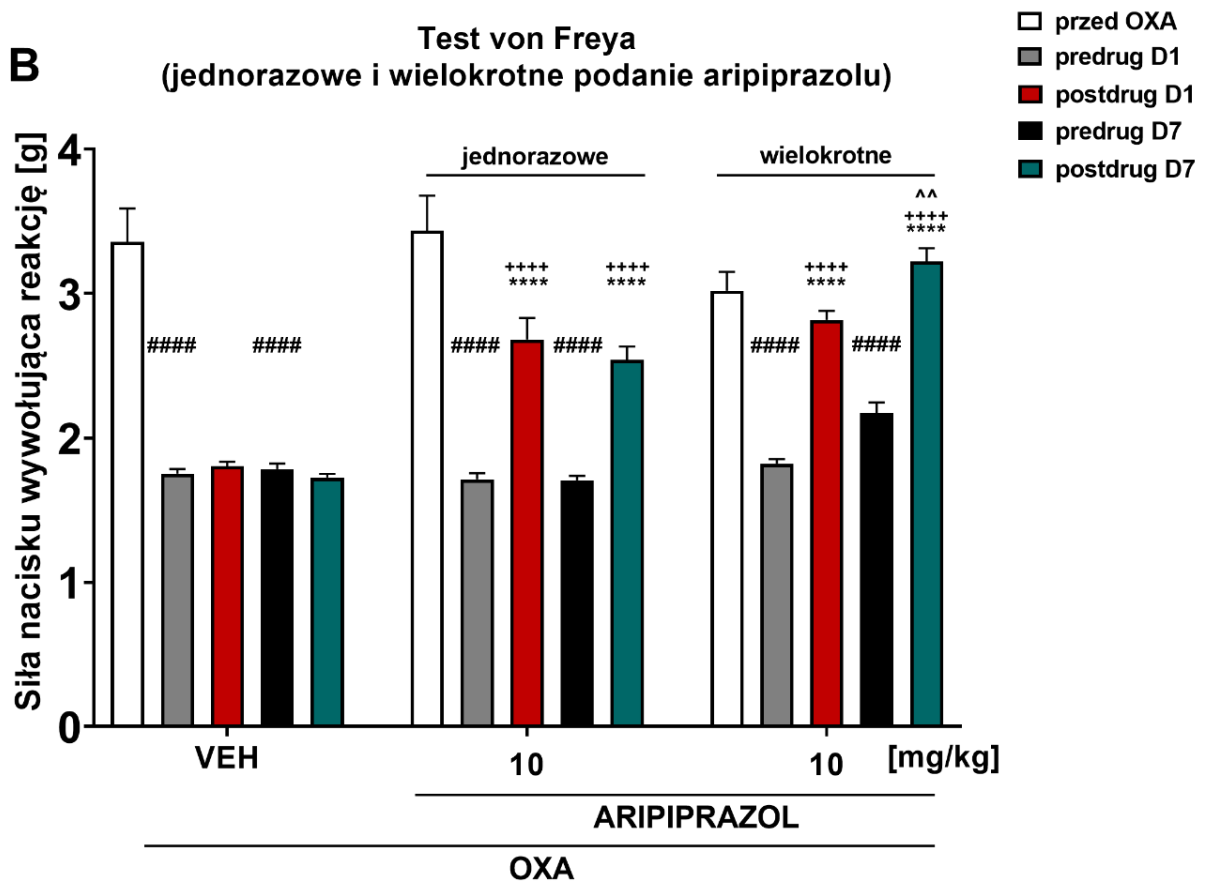
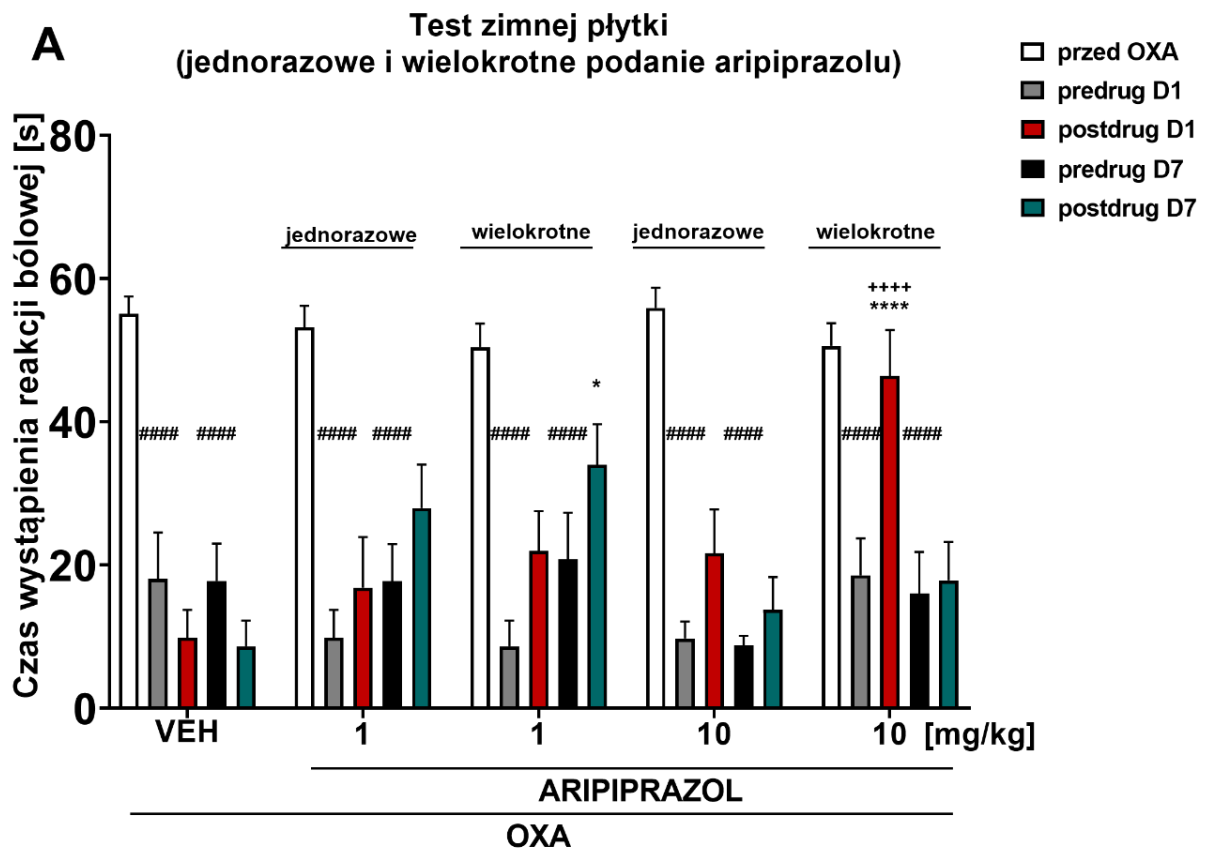
W teście zimnej płytki podanie oksaliplatyny wywołało znamienne skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej we wszystkich grupach, zarówno pierwszego, jak i siódmego dnia eksperymentu ($P<0.0001$, Rycina 28A). Istotnie statystycznie łagodzenie objawów nadwrażliwości termicznej w pierwszym dniu eksperymentu wykazał aripiprazol podawany w dawce 10 mg/kg w porównaniu do pomiaru po podaniu oksaliplatyny oraz względem odpowiadającego pomiaru grupy kontrolnej ($P<0.0001$, Rycina 28A). Po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny znamienne działanie przeciwbólowe wykazano wyłącznie dla grupy otrzymującej wielokrotnie aripiprazol w dawce 1 mg/kg ($P<0.05$, Rycina 28A).

W teście von Freya w celu ograniczenia ilości zwierząt wykorzystanych w eksperymentach, przebadano aripiprazol wyłącznie w najwyższej dawce – 10 mg/kg. Podanie oksaliplatyny wywołało istotnie statystycznie obniżenie progu bólowego mierzonego po podaniu cytostatyka w pierwszym i siódmym dniu eksperymentu ($P<0.0001$, Rycina 28B). Efekt analgetyczny w obu punktach czasowych zaobserwowano zarówno dla podania jednorazowego i wielokrotnego aripiprazolu w dawce 10 mg/kg w porównaniu do pomiaru po podaniu oksaliplatyny oraz względem odpowiadającego pomiaru grupy kontrolnej ($P<0.0001$, Rycina 28B). Dodatkowo w schemacie podania wielokrotnego podanie aripiprazolu w siódmym dniu pomiarów istotnie statystycznie podwyższało próg bólowy w porównaniu do pomiaru przed podaniem leku grupy otrzymującej aripiprazol jednorazowo ($P<0.01$, Rycina 28B).

Wyniki niniejszego eksperymentu opublikowano w pracy: Sałat, K., Furgała, A., & Sałat, R. (2019). Interventional and preventive effects of aripiprazole and ceftriaxone used alone or in combination on oxaliplatin-induced tactile and cold allodynia in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 882-890.

Rycina 28. Wpływ aripiprazolu (1 i 10 mg/kg, i.p.) podawanego jednorazowo i wielokrotnie na próg bólowy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla n=8–10 (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Bonferroniego. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ##### P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję przed podaniem aripiprazolu w odpowiednim punkcie czasowym: ++++ P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar postdrug grupy kontrolnej: * P<0.05, **** P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar postdrug siły nacisku w grupie otrzymującej jednorazowo aripiprazol: ^^ P<0.01. OXA – oksaliplatyna, predrug – pomiar przed podaniem aripiprazolu, postdrug – pomiar po podaniu aripiprazolu, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu.



4.2.9 Badanie oceniające skuteczność ceftriaksonu

Ceftriakson należy do grupy antybiotyków β -laktamowych. Jest cefalosporyną III generacji o działaniu bakteriobójczym. Oprócz podstawowej aktywności przeciwbakteryjnej, wykazuje również aktywność ośrodkową, zwiększając ekspresję transportera dla glutaminianu (GLT-1) w OUN [313]. Kwas glutaminowy jest jednym z kluczowych neuroprzekaźników pronocyceptywnych [314]. Regulacja „w dół” transportera GLT-1 w astrocytach jest jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój bólu neuropatycznego [315,316]. Biorąc pod uwagę powyższe, ceftriakson może być ciekawą opcją leczenia i łagodzenia objawów CIPN.

Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{14,131}=1.574$, $P>0.05$; *efekt „czasu”* $F_{4,524}=243.1$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{56,524}=2.006$, $P<0.0001$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{10,95}=14.03$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{4,380}=339.4$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{40,380}=7.843$, $P<0.0001$.

W teście zimnej płytki podanie oksaliplatyny wywołało znamienne obniżenie progu bólowego zarówno pierwszego, jak i siódmego dnia pomiarów ($P<0.0001$, Rycina 29A). Żadna z zastosowanych dawek i schematów podania ceftriaksonu nie wykazała istotnego efektu przeciwbólowego w teście zimnej płytki.

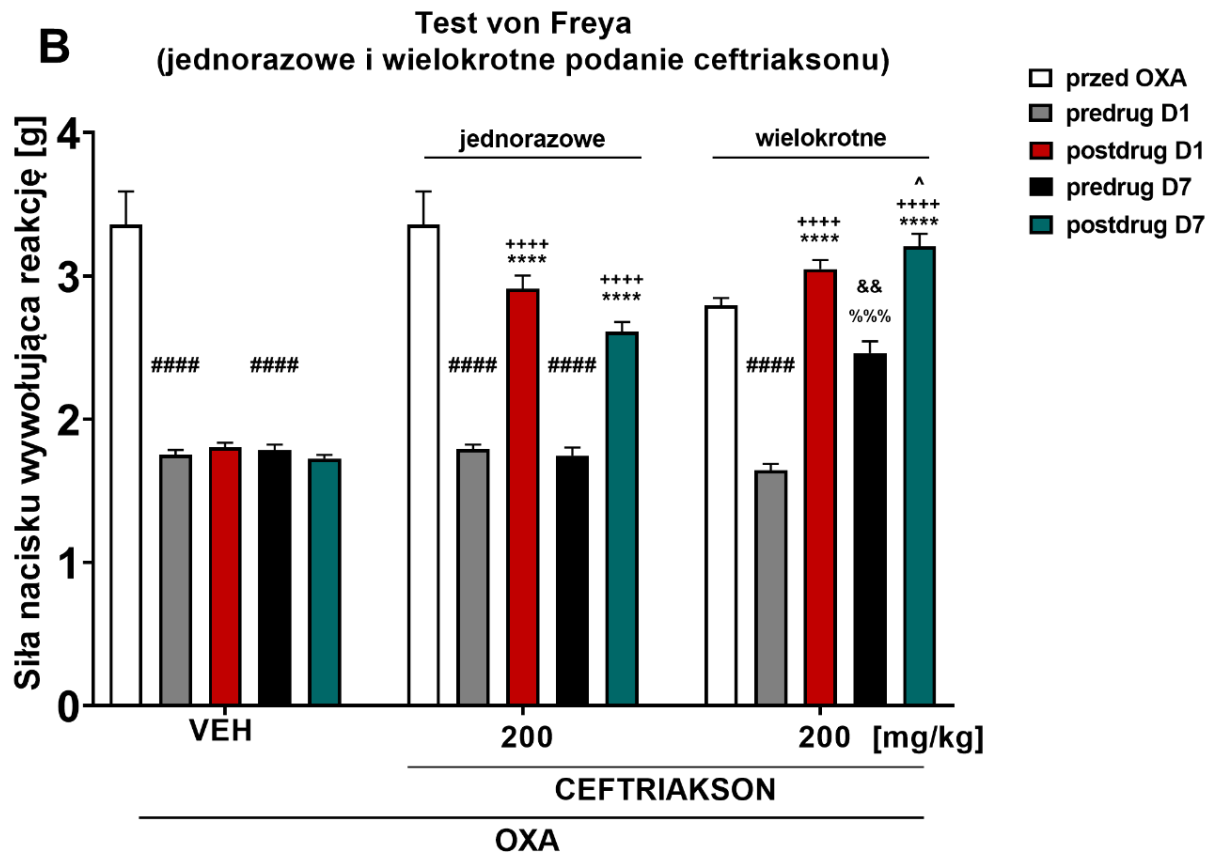
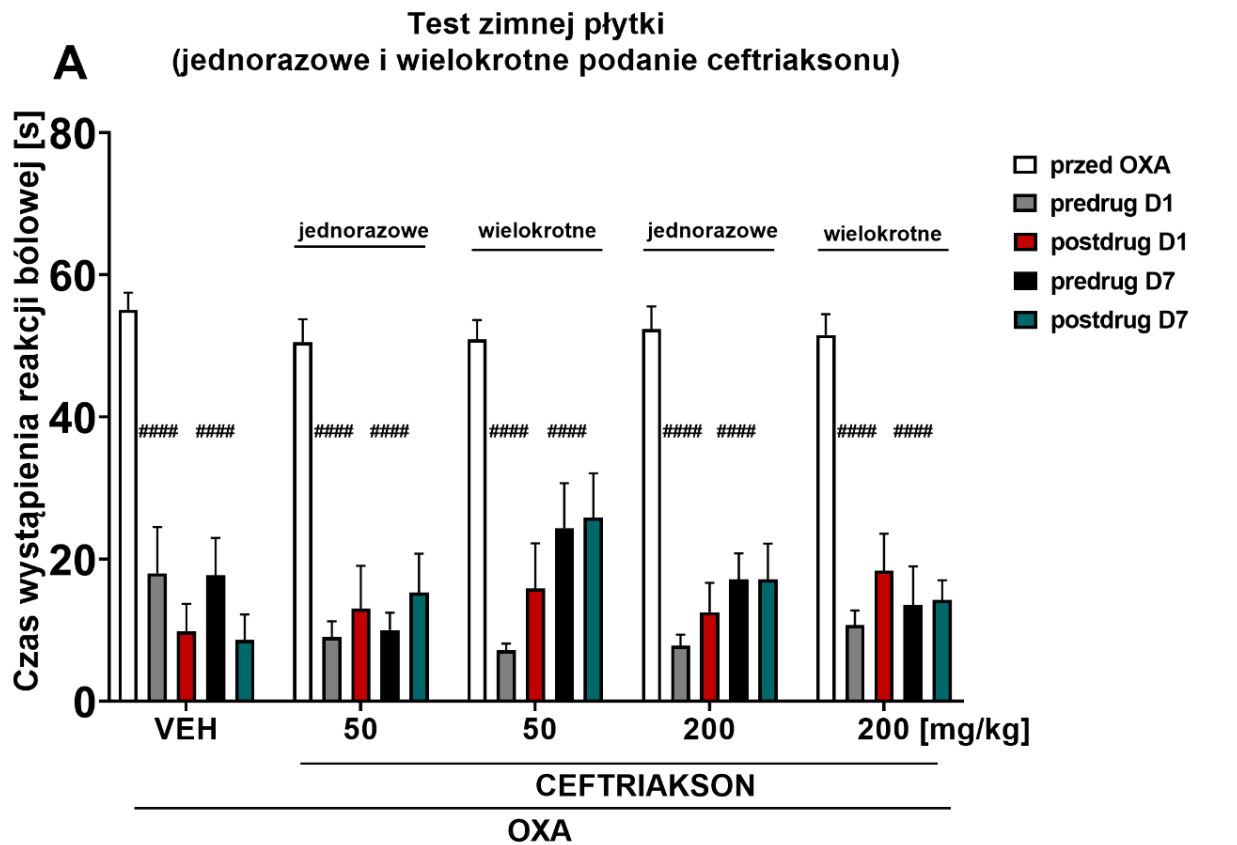
W teście von Freya podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie obniżenie progu bólowego we wszystkich grupach w pierwszym dniu eksperymentu ($P<0.0001$, Rycina 29B) oraz w grupie jednorazowo podawanego ceftriaksonu w dawce 200 mg/kg po siedmiu dniach od podania cytostatyka ($P<0.0001$, Rycina 29B). W przypadku podania wielokrotnego pomiar wykonany po tygodniu od podania oksaliplatyny był istotnie statystycznie wyższy, co świadczy o działaniu ochronnym ceftriaksonu na rozwój nadwrażliwości mechanicznej po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny. Wartość progu bólowego była wyższa od wartości otrzymanej w grupie kontrolnej po podaniu oksaliplatyny ($P<0.01$, Rycina 29B) oraz od wartości otrzymanych w grupie jednorazowo podanego ceftriaksonu ($P<0.001$, Rycina 29B).

Zarówno w grupie otrzymującej ceftriakson jednorazowo, jak i wielokrotnie oznaczono silny efekt przeciwbólowy po podaniu antybiotyku pierwszego i siódmego dnia eksperymentu w porównaniu do pomiaru po podaniu oksaliplatyny oraz względem odpowiadającego pomiaru grupy kontrolnej ($P<0.0001$, Rycina 29B). Pomiar po podaniu leku grupy otrzymującej wielokrotnie ceftriakson w dawce 200 mg/kg osiągnął poziom porównywalny do pomiarów oznaczonych dla zwierząt, które nie otrzymały oksaliplatyny i był istotnie statystycznie wyższy niż w przypadku grupy, która otrzymała jednorazowo ceftriakson ($P<0.05$, Rycina 29B).

Wyniki niniejszego eksperymentu opublikowano w pracy: Sałat, K., Furgała, A., & Sałat, R. (2019). Interventional and preventive effects of aripiprazole and ceftriaxone used alone or in combination on oxaliplatin-induced tactile and cold allodynia in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 882-890.

Rycina 29. Wpływ ceftriaksonu (50 i 200 mg/kg, i.p.) podawanego jednorazowo i wielokrotnie na próg bólowy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksalipłaty (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla n=8–10 (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Bonferroniego. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksalipłaty: ##### P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję przed podaniem ceftriaksonu w odpowiednim punkcie czasowym: ++++ P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar postdrug grupy kontrolnej: **** P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar postdrug siły nacisku w grupie otrzymującej jednorazowo ceftriakson: ^ P<0.05, znamienność statystyczna vs. pomiar predrug siły nacisku grupy otrzymującej jednorazowo ceftriakson: %%% P<0.001; znamienność statystyczna vs. pomiar predrug grupy kontrolnej: && P<0.01. OXA – oksalipłaty, predrug – pomiar przed podaniem ceftriaksonu, postdrug – pomiar po podaniu ceftriaksonu, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu.



4.2.10 Badanie oceniające skuteczność befiradolu (NLX-112)

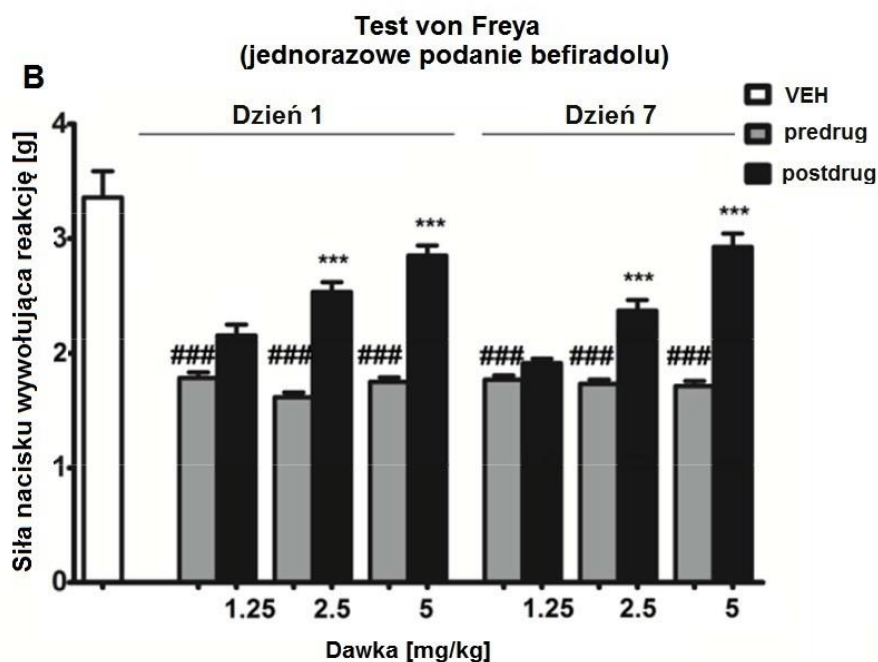
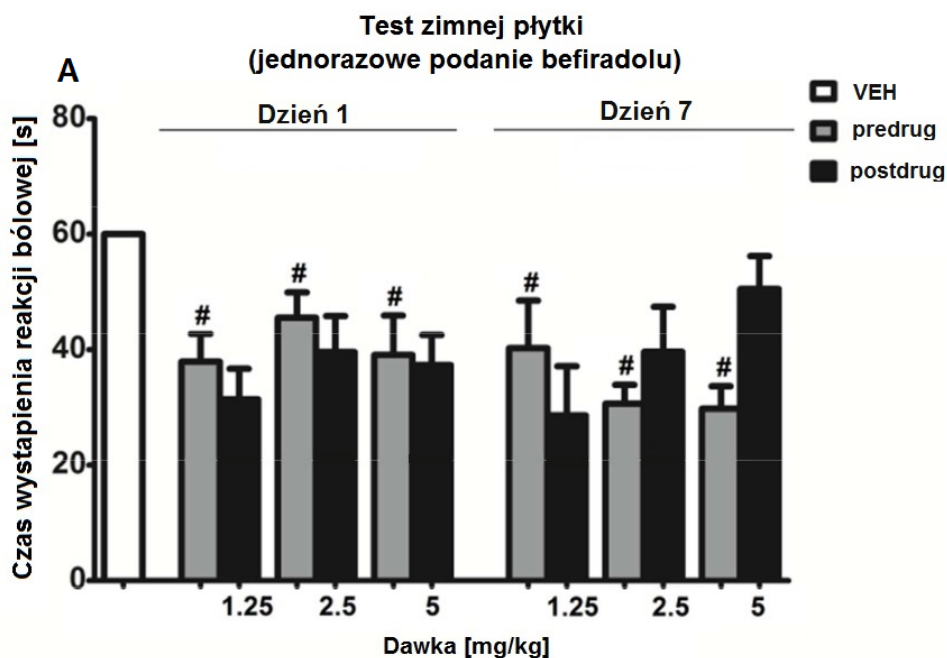
Transmisja serotonergiczna to ważna komponenta działania leków stosowanych w farmakoterapii bólu. Jak wspomniano wcześniej, o ile leki z grupy SSRI nie są zalecane jako preparaty pierwszego wyboru w leczeniu bólu neuropatycznego, to selektywne pobudzenie/hamowanie układu serotonergicznego może wykazywać istotny wpływ w łagodzeniu objawów różnego typu neuropatii. Badania obejmujące związki selektywnie działające na określone receptory i podtypy receptorów 5-HT są obiecujące w kontekście poszukiwania nowych terapii bólu. Do takich związków zalicza się befiradol, który jest selektywnym agonistą receptorów 5-HT_{1A}.

W ramach eksperymentu befiradol przebadano w trzech dawkach: 1.25, 2.5 oraz 5 mg/kg podawanych dootrzewnowo. Wpływ tego związku na próg pobudliwości bólowej indukowanej bodźcem termicznym oceniono w teście zimnej płytki, natomiast wpływ na nadwrażliwość mechaniczną w teście von Freya. Test zimnej płytki: *jednoczynnikowa analiza wariancji: efekt „badanego związku”* $F_{12,99}=2.328$, $P<0.05$; test von Freya: *jednoczynnikowa analiza wariancji: efekt „badanego związku”* $F_{12,117}=37.89$, $P<0.0001$.

W teście zimnej płytki podanie oksaliplatinę powodowało istotne statystycznie skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej pierwszego dnia eksperymentu oraz po 7 dniach od podania oksaliplatinę ($P<0.05$, Rycina 30A) w porównaniu do grupy kontrolnej, która nie otrzymała cytostatyka. Zarówno pierwszego, jak i siódmego dnia eksperymentu, żadna z zastosowanych dawek befiradolu nie wykazała znamiennego działania przeciwbólowego w teście zimnej płytki.

W teście von Freya pojedyncze podanie oksaliplatinę wywołało istotne statystycznie obniżenie progu bólowego mierzonego 3 h od podania oksaliplatinę oraz w siódmym dniu eksperymentu w stosunku do pomiaru grupy kontrolnej, która nie otrzymała cytostatyka ($P<0.001$, Rycina 30B). Nadwrażliwość mechaniczną (dotykową) w teście von Freya befiradol łagodził znamienne w pierwszym i siódmym dniu eksperymentu w dawkach 2.5 i 5 mg/kg ($P<0.001$, Rycina 30B). W obu pomiarach, dawka 5 mg/kg wykazywała silniejszą aktywność przeciwbólową, w porównaniu do dawki 2.5 mg/kg (Rycina 30B).

Wyniki niniejszego eksperymentu opublikowano w pracy: Sałat, K., Kołaczkowski, M., Furgała, A., Rojek, A., Śniecikowska, J., Varney, M. A., & Newman-Tancredi, A. (2017). Antinociceptive, antiallodynic and antihyperalgesic effects of the 5-HT_{1A} receptor selective agonist, NLX-112 in mouse models of pain. *Neuropharmacology*, 125, 181-188.



Rycina 30. Wpływ befiradolu (1.25, 2.5 i 5 mg/kg, *i.p.*) na próg bólowy zwierząt mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny oraz 7 dni po jej podaniu. Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla $n=8-10$ (\pm SEM). Analiza statystyczna: jednoczynnikowa analiza wariancji i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji/siły nacisku wywołującej reakcję bólową zwierząt, które nie otrzymały oksaliplatyny: # $P<0.05$, ### $P<0.001$; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję przed podaniem befiradolu w odpowiednim punkcie czasowym: *** $P<0.001$. Predrug – pomiar przed podaniem befiradolu, postdrug – pomiar po podaniu befiradolu.

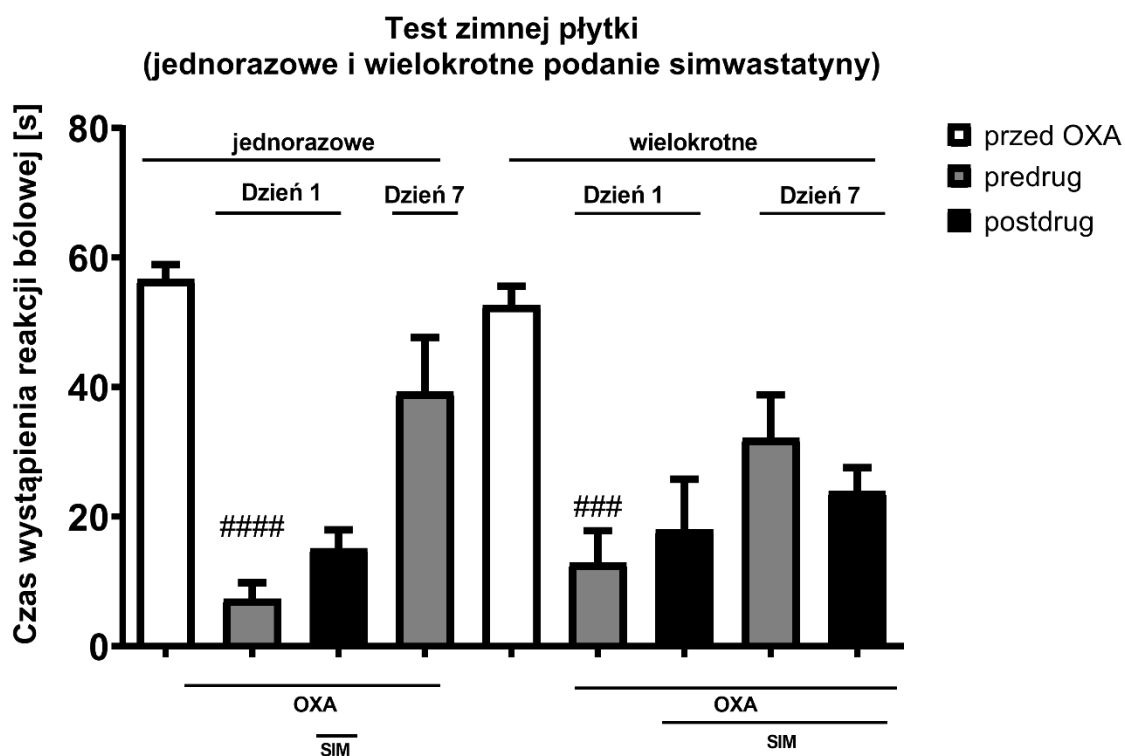
4.2.11 Badanie oceniające skuteczność simwastatyny

4.2.11.1 Jednorazowe i wielokrotne podanie simwastatyny (podanie siedmiodniowe)

Simwastatyna jest szeroko stosowanym lekiem u osób z hipercholesterolemią [317]. Oprócz obniżania poziomu lipidów we krwi, simwastatyna wykazuje również działanie plejotropowe [318]. Dane literaturowe wskazują, że lek ten może łagodzić objawy bólu, w tym bólu neuropatycznego [319]. Efekt terapeutyczny wynikający z działania plejotropowego simwastatyny wymaga czasu, stąd w przedstawionym eksperymencie oceniającym skuteczność łagodzenia objawów CIPN, wykorzystano podanie wielokrotne simwastatyny przez siedem dni oraz oceniono skuteczność w schemacie podania jednorazowego.

Badania wstępne w teście zimnej płytki wykorzystujące podanie simwastatyny ujawniły w schemacie podania jednorazowego: efekt „badanego związku” $F_{5,44}=14.16$, $P<0.0001$ oraz w schemacie podania wielokrotnego: efekt „badanego związku” $F_{9,70}=6.657$, $P<0.0001$.

Podanie oksaliplatyny powodowało istotne skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej wyłącznie w pierwszym dniu eksperymentu zarówno w grupie otrzymującej simwastatynę jednorazowo ($P<0.0001$, Rycina 31), jak i wielokrotnie ($P<0.001$, Rycina 31). Podanie simwastatyny nie wykazało istotnego statystycznie efektu przeciwbólowego zarówno pierwszego, jak i siódmego dnia pomiarów w obu schematach podania.



Rycina 31. Wpływ simwastatyny (100 mg/kg, p.o.) podawanej jednorazowo i wielokrotnie (7 dni) na próg bólowy zwierząt mierzony w teście zimnej płytki.

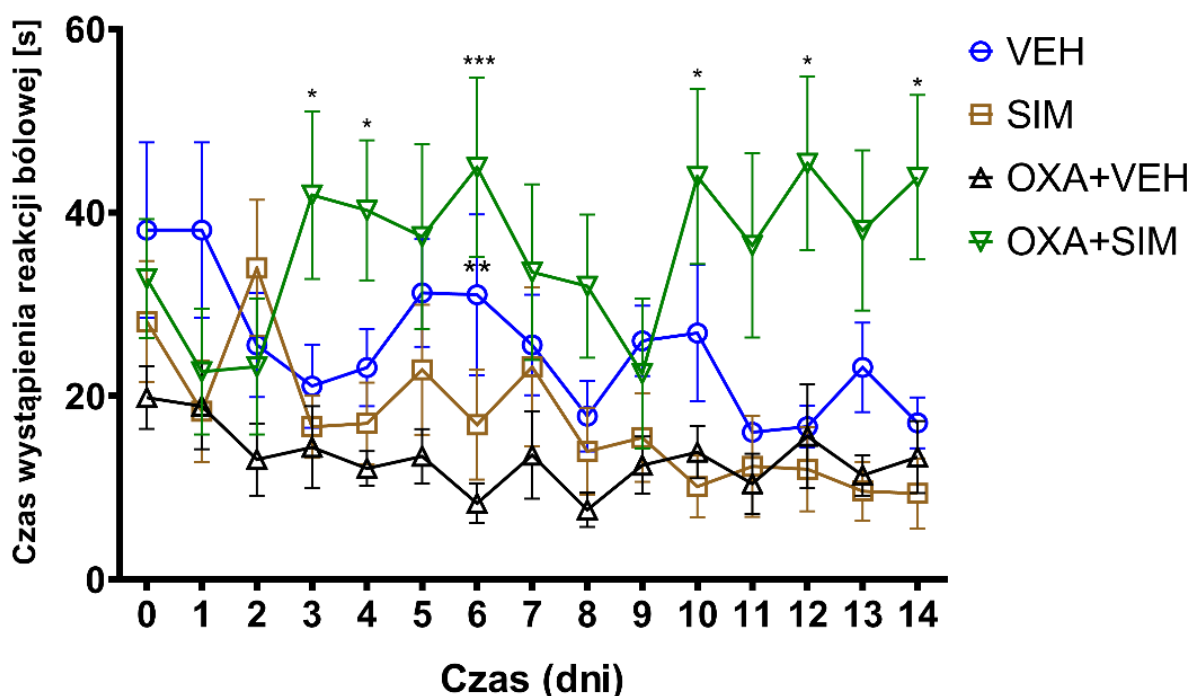
Nadwrażliwość termiczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny oraz 7 dni po jej podaniu. Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej (\pm SEM) w odpowiedzi na stymulację termiczną (temperatura 2.5 °C) dla $n = 8-10$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa analiza wariancji i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$. OXA – oksaliplatyna, SIM – simwastatyna, predrug – pomiar przed podaniem simwastatyny, postdrug – pomiar po podaniu simwastatyny.

4.2.11.2 Wielokrotne podanie simwastatyny – podanie czternastodniowe

W oparciu o wyniki zawarte w Rozdziale 4.2.11.1, jak również inne badania [319] sugerujące, iż plejotropowe działanie simwastatyny oraz zahamowanie różnych szlaków aktywności w organizmie może odgrywać kluczową rolę w leczeniu i łagodzeniu objawów bólu neuropatycznego [319]. W tym celu zaplanowano dodatkowe badanie mające ocenić skuteczność simwastatyny w łagodzeniu objawów CIPN w schemacie podania wielokrotnego (14-dniowego) tego leku. W celu przeprowadzenia eksperymentu simwastatynę podawano codziennie przez 14 dni, przyjmując jako pierwszy dzień – dzień podania oksaliplatyny. Pomiary oceniające wrażliwość termiczną zwierząt wykonywane były codziennie, po dwóch godzinach od podania leku.

Simwastatyna podawana wielokrotnie wykazała potencjalną aktywność przeciwbólową obserwowaną już trzeciego i czwartego dnia testu ($P < 0.05$, Rycina 32) w porównaniu do grupy kontrolnej otrzymującej oksaliplatynę. Najsilniejsze działanie łagodzące objawy neuropatii zostało zaobserwowane w szóstym dniu testu ($P < 0.001$, Rycina 32). Podobny efekt obserwowano 10, 12 i 14 dnia testu ($P < 0.05$, Rycina 32). Test zimnej płytki: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanego związku” $F_{1,13}=12.98$, $P < 0.01$; efekt „czasu” $F_{14,182}=1.46$, $P > 0.05$; efekt interakcji $F_{14,182}=1.99$, $P < 0.05$.

Test zimnej płytki (wielokrotne podanie simwastatyny)



Rycina 32. Wpływ simwastatyny (100 mg/kg, p.o.) podawanej wielokrotnie (14 dni) na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki.

Nadwrażliwość termiczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny oraz codziennie przez 14 dni 2 h po podaniu simwastatyny. Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej (\pm SEM) w odpowiedzi na stymulację termiczną (temperatura 2.5 °C) dla $n=5-10$. Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Bonferroniego. Znamienność statystyczna vs. pomiar czasu wystąpienia reakcji bólowej w grupie kontrolnej otrzymującej oksaliplatynę: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. OXA – oksaliplatyna, SIM – simwastatyna.

4.2.12 Badanie oceniające skuteczność minocykliny

Minocyklina należy do antybiotyków tetracyklinowych o dobrej penetracji do mózgu i silnych właściwościach przeciwzapalnych w OUN, wpływających na jej działanie neuroprotektoryjne. Dodatkowo istnieją dowody potwierdzające aktywność przeciwzapalną, przeciwutleniającą i antyapoptyczną minocykliny oraz zdolność modulowania neurotransmisji glutaminianergicznej, czy monoaminergicznej [320,321]. Z punktu widzenia CIPN, taki mechanizm działania oraz wysoka przenikalność przez barierę krew-mózg stanowią silne podstawy do wykorzystania minocykliny jako potencjalnego leku łagodzącego objawy CIPN. Aby sprawdzić działanie minocykliny w modelu CIPN wyznaczono dawkę aktywną i podprogową minocykliny oraz oceniono, jak na skuteczność łagodzenia objawów bólu neuropatycznego wpłynie podanie wielokrotne.

Skuteczność analgetyczną minocykliny oceniono w teście zimnej płytki i teście von Freya. Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{5,54}=40.84$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3.332,179.9}=137.2$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{20,216}=9.099$, $P<0.0001$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{5,54}=117.3$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3.341,180.4}=284.5$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{20,216}=30.84$, $P<0.0001$.

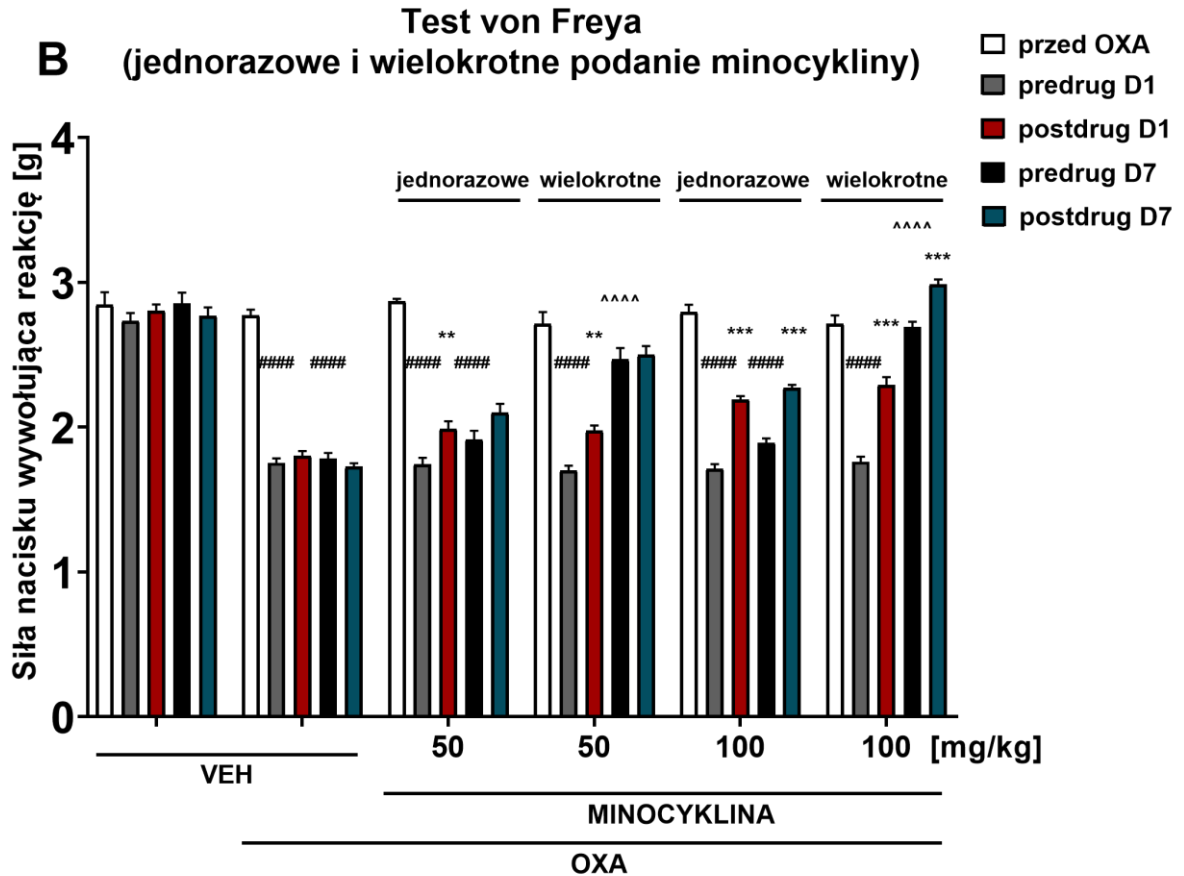
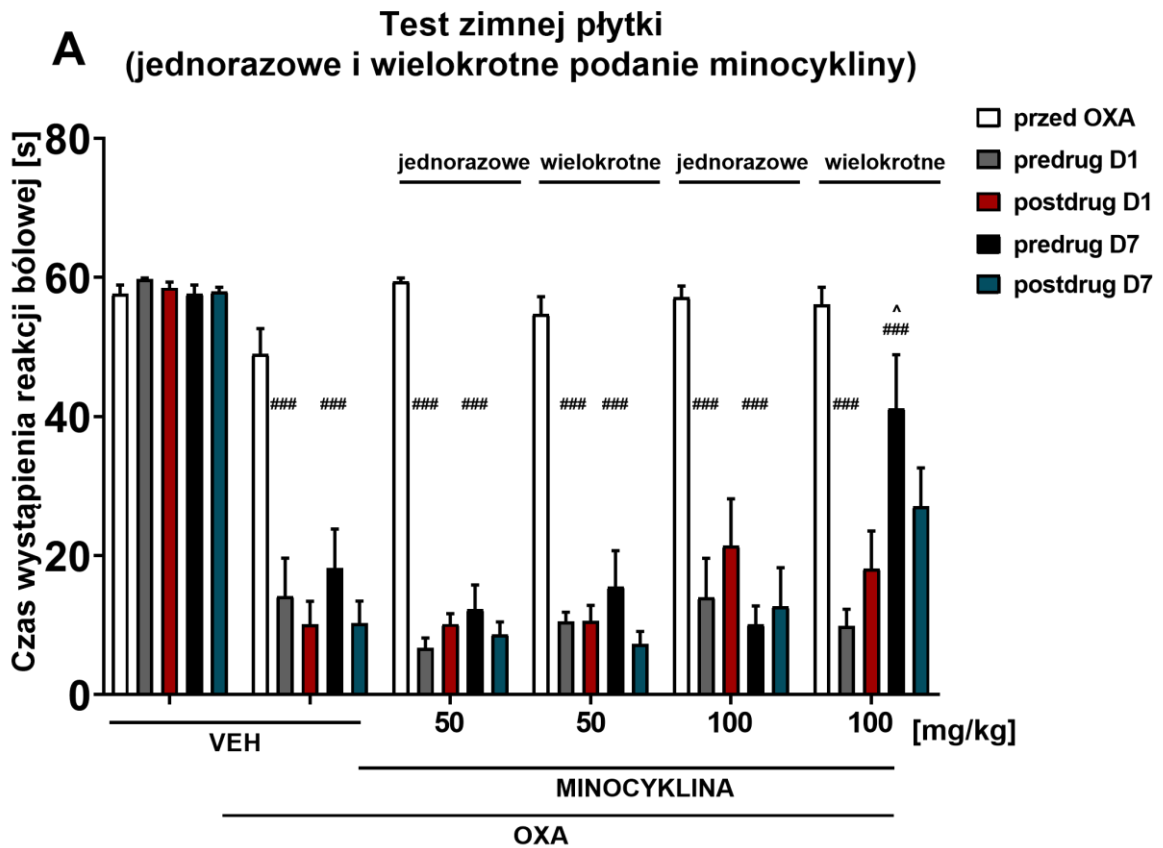
W teście zimnej płytki podanie oksaliplatyny spowodowało istotne statystycznie skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej we wszystkich grupach eksperymentalnych pierwszego i siódmego dnia eksperymentu ($P<0.001$, Rycina 33A). Jednorazowe podanie minocykliny w dawkach 50 i 100 mg/kg nie wpłynęło znamienne na czas reakcji bólowej w teście zimnej płytki zarówno w pierwszym, jak i siódmym dniu eksperymentu. W schemacie podania wielokrotnego minocyklina w dawce 50 mg/kg nie wykazała istotnego efektu przeciwbólowego, natomiast wielokrotne podanie minocykliny w dawce 100 mg/kg istotnie statystycznie podwyższało próg bólowy mierzony przed podaniem kolejnej dawki minocykliny siódmego dnia testu w porównaniu do pomiaru przed podaniem leku z pierwszego dnia eksperymentu ($P<0.05$, Rycina 33A).

W teście von Freya podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie obniżenie progu bólowego w odpowiedzi na działający bodziec mechaniczny pierwszego dnia eksperymentu we wszystkich grupach eksperymentalnych ($P<0.0001$, Rycina 33B). Efekt ten utrzymał się do siódmego dnia, wyłącznie w grupach jednorazowego podania minocykliny ($P<0.0001$, Rycina 33B). Podanie jednorazowe minocykliny w dawce 50 mg/kg wywołało istotny efekt przeciwbólowy pierwszego dnia eksperymentu ($P<0.01$, Rycina 33B). W przypadku minocykliny w dawce 100 mg/kg efekt przeciwbólowy został osiągnięty zarówno pierwszego, jak i siódmego dnia testu po podaniu jednorazowym i wielokrotnym ($P<0.001$, Rycina 33B). Wielokrotne podanie minocykliny w dawkach 50 i 100 mg/kg wywołało znamienne podwyższenie progu bólowego w odpowiedzi na stosowany bodziec mechaniczny po tygodniu od podania oksaliplatyny w porównaniu do pomiaru przed podaniem leku wykonanego pierwszego dnia eksperymentu ($P<0.0001$, Rycina 33B).

Wyniki niniejszego eksperymentu opublikowano w pracy: Sałat, K., Furgała-Wojas, A., & Sałat, R. (2021). The microglial activation inhibitor minocycline used alone and in combination with duloxetine, attenuates pain caused by oxaliplatin in mice. *Molecules*, 26(12), 3577.

Rycina 33. Wpływ minocykliny (50 i 100 mg/kg, *i.p.*) podawanej jednorazowo i wielokrotnie na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla $n=9-10$ (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły wywołującej reakcję bólową przed podaniem minocykliny w odpowiednim punkcie czasowym: ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; znamienność statystyczna vs. pomiar po podaniu oksaliplatyny wykonany pierwszego dnia: ^ $P<0.05$, ^^^ $P<0.0001$. OXA – oksaliplatyna, predrug – pomiar przed podaniem minocykliny, postdrug – pomiar po podaniu minocykliny, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu. Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.



4.3 ANALIZA SKUTECZNOŚCI ANALGETYCZNEJ WYBRANYCH POŁĄCZEŃ LEKÓW W MODELU NEUROPATII OBWODOWEJ INDUKOWANEJ OKSALIPLATYNĄ

4.3.1 Ocena skuteczności przeciwbólowej duloksetyny w połączeniu z ambroksolem

W ramach kolejnego etapu badań postanowiono ocenić, jak na nadwrażliwość termiczną i mechaniczną w modelu CIPN wpłynie skojarzone podanie duloksetyny i ambroksolu. W tym celu zwierzęta otrzymywały duloksetynę w dawkach 10 i 30 mg/kg w połączeniu z ambroksolem w dawce 90 mg/kg w różnych sekwencjach podań.

Skuteczność analgetyczną zastosowanego podania leków oceniono w testach von Freya i zimnej płytki. Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzanimi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{7,72}=1.123$, $P>0.05$; *efekt „czasu”* $F_{4,288}=307.8$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{28,288}=1.481$, $P>0.05$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzanimi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{7,72}=14.16$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{4,288}=344.8$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{28,288}=19.24$, $P<0.0001$.

W ramach eksperymentu ujawniono działanie toksyczne dla tego połączenia leków. Podanie jednoczesne duloksetyny w dawce 30 mg/kg i ambroksolu w dawce 90 mg/kg pierwszego dnia pomiarów wywołało objawy toksyczne, objawiające się jako niezdolność ruchowa, uniemożliwiająca przeprowadzenie testów behawioralnych.

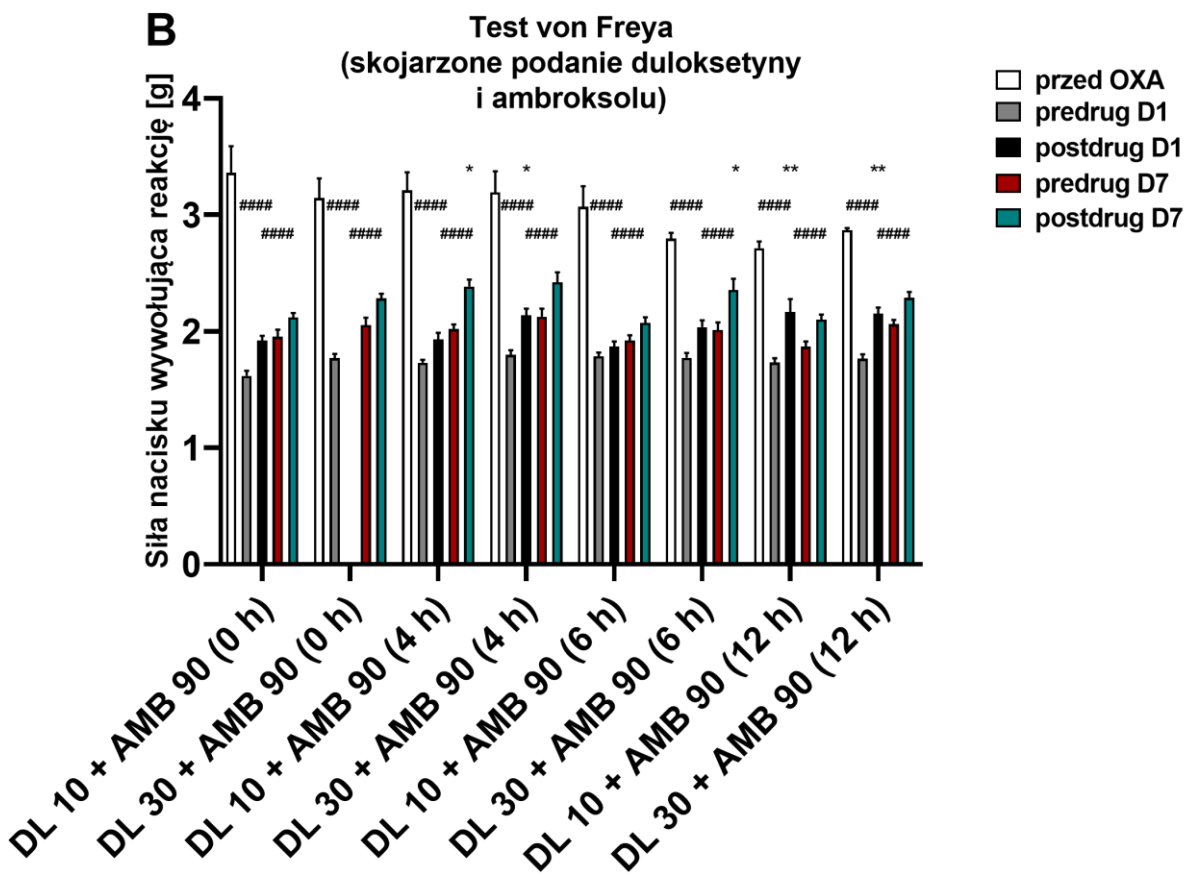
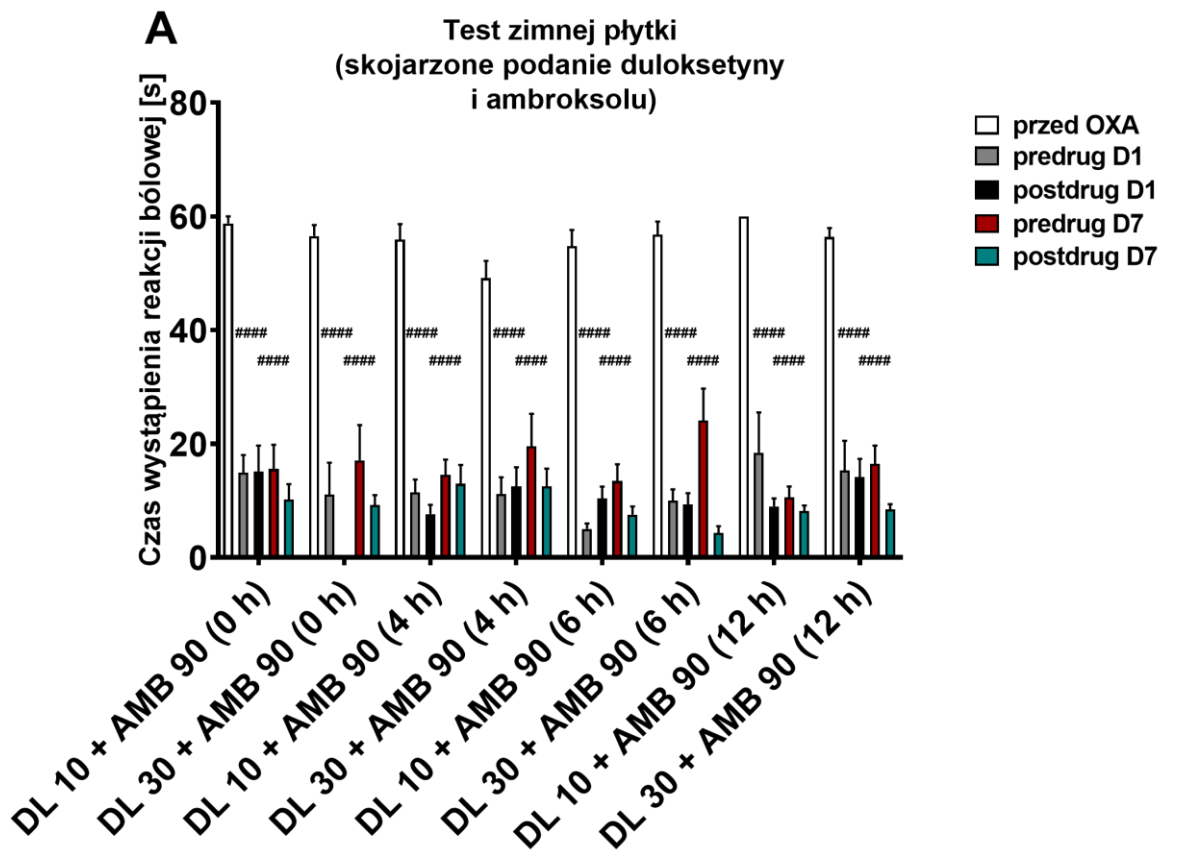
W teście zimnej płytki podanie oksaliplatyny spowodowało istotne statystycznie skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na działanie bodźca termicznego pierwszego dnia eksperymentu we wszystkich grupach eksperymentalnych ($P<0.0001$, Rycina 34A). Efekt ten utrzymał się do siódmego dnia testu ($P<0.0001$, Rycina 34A). Zastosowanie podania skojarzonego nie wykazało istotnego efektu analgetycznego, łagodzącego objawy nadwrażliwości termicznej w żadnym z zastosowanych wariantów podań, zarówno pierwszego, jak i siódmego dnia eksperymentu. W przypadku grup otrzymujących duloksetynę w dawce 30 mg/kg w połączeniu z ambroksolem w dawce 90 mg/kg zaobserwowano nieznaczne podwyższenie wartości pomiarów zerowych otrzymanych siódmego dnia eksperymentu, świadczące o potencjale hamowania rozwoju nadwrażliwości termicznej po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny.

W teście von Freya jednorazowe podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie obniżenie siły nacisku wywołującej reakcję, w stosunku do pomiarów wykonanych u zwierząt, które nie otrzymały cytostatyka pierwszego i siódmego dnia eksperymentu ($P<0.0001$, Rycina 34B). W przypadku pomiarów zerowych wykonywanych siódmego dnia nie zaobserwowano tendencji do podwyższenia progu bólowego w żadnym z zastosowanych połączeń leków.

Pierwszego dnia eksperymentu istotne statystycznie podwyższenie wartości pomiarów siły nacisku w teście von Freya zostało zaobserwowane dla grup, które otrzymały: duloksetynę w dawce 30 mg/kg i ambroksol w dawce 90 mg/kg, a pomiar wykonano po 4 h od podania duloksetyny ($P<0.05$, Rycina 34B) oraz duloksetynę w dawkach 10 i 30 mg/kg, oraz ambroksol w dawce 90 mg/kg przebadanych po 12 h od podania duloksetyny ($P<0.01$, Rycina 34B). W siódmym dniu pomiarów znamienne działanie wykazały połączenia: duloksetyna 10 mg/kg i ambroksol 90 mg/kg przebadane po 4 h od podania pierwszego leku ($P<0.05$, Rycina 34B) oraz duloksetyna 30 mg/kg i ambroksol 90 mg/kg przebadane po 6 h od podania duloksetyny ($P<0.05$, Rycina 34B).

Rycina 34. Wpływ duloksetyny (10 i 30 mg/kg, *i.p.*) w połączeniu z ambroksolem (90 mg/kg, *i.p.*) podawanych w schemacie CDT na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla $n=10$ (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ##### $P<0.0001$; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły wywołującej reakcję bólową przed podaniem leków: duloksetyny i ambroksolu w odpowiednim punkcie czasowym: * $P<0.05$, ** $P<0.01$. OXA – oksaliplatyna, DL – duloksetyna, AMB – ambroksol, predrug – pomiar przed podaniem związków, postdrug – pomiar po podaniu związków, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu, czas: 0 h – podanie jednoczesne związków (badanie aktywności analgetycznej wykonano po 1 h od podania leków), 4 h – badanie wykonano po 4 h od podania pierwszego leku, 6 h – badanie wykonano po 6 h od podania pierwszego leku, 12 h – badanie wykonano po 12 h od podania pierwszego leku.



4.3.1.1 Ocena skuteczności przeciwbólowej duloksetyny po 1 h, 4 h, 6 h oraz 12 h od podania

W celu oceny, czy działanie analgetyczne zastosowanego połączenia leków nie wynika z rozwijającego się w czasie działania duloksetyny, podanej jako pierwszy lek w ramach zastosowanego schematu CDT, wykonano pomiary oceniające wpływ duloksetyny podawanej w dawkach 10 i 30 mg/kg na nadwrażliwość termiczną i mechaniczną mierzone w teście zimnej płytki i teście von Freya po 1 h, 4 h, 6 h i 12 h od podania.

Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{7,72}=2.184$, $P<0.05$; *efekt „czasu”* $F_{4,288}=201.0$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{28,288}=1.46$, $P>0.05$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{7,72}=18.87$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{4,288}=148.5$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{28,288}=7.23$, $P<0.0001$.

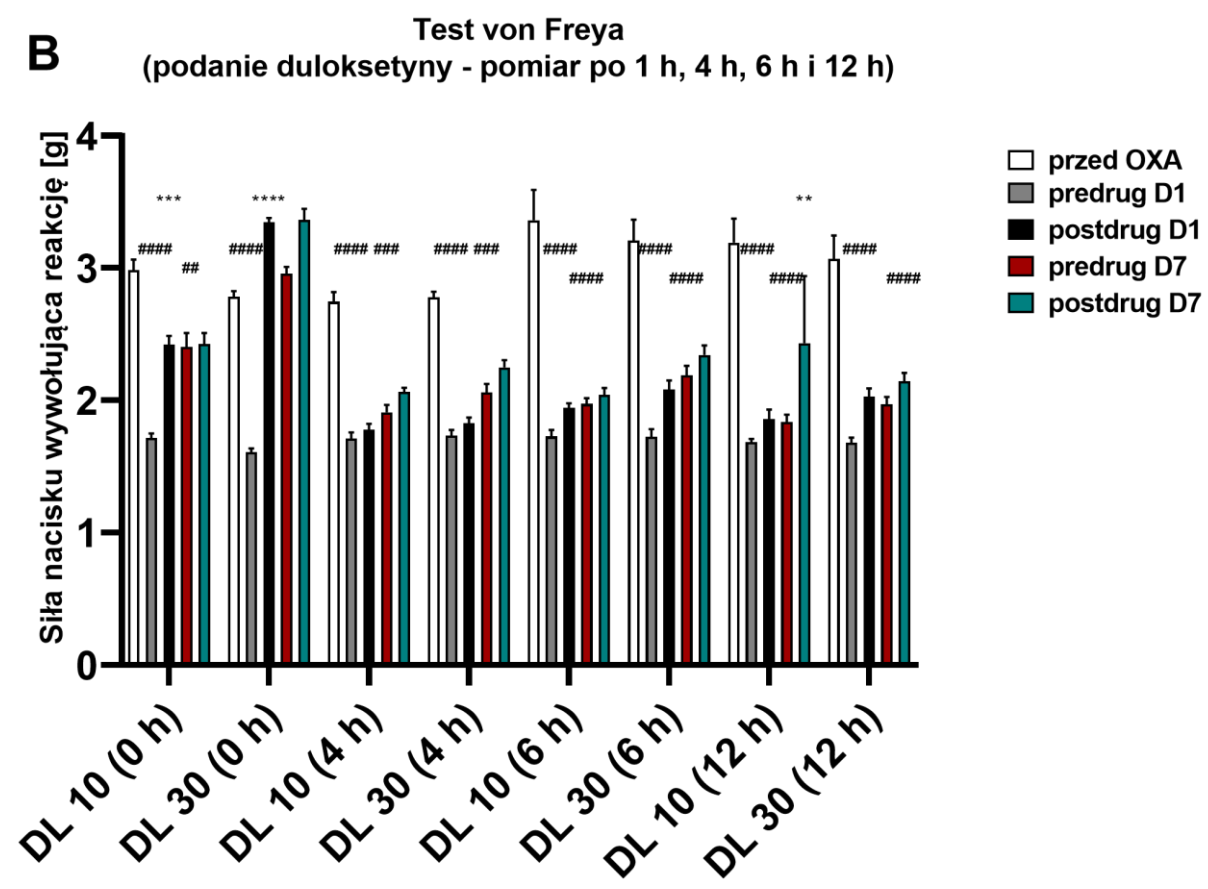
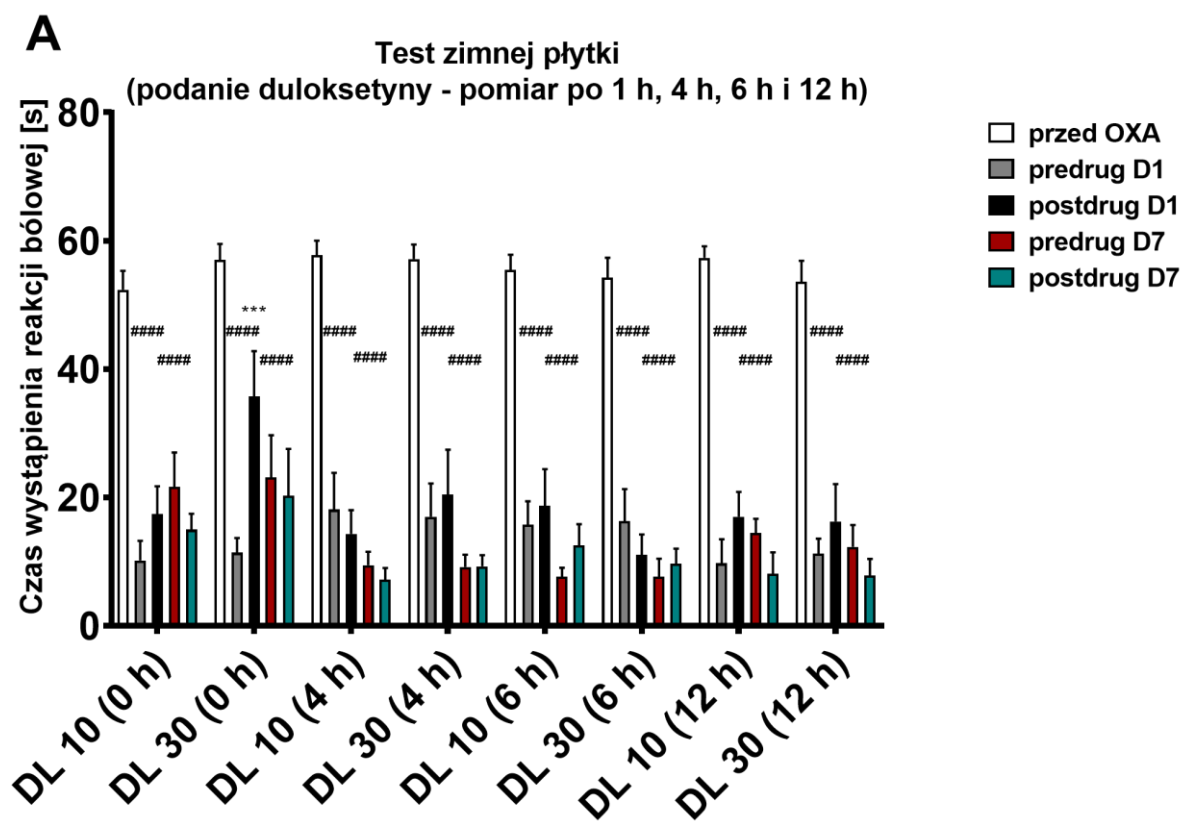
W teście zimnej płytki podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej zarówno pierwszego, jak i siódmego dnia eksperymentu we wszystkich grupach eksperymentalnych ($P<0.0001$, Rycina 35A). Skuteczność przeciwbólowa duloksetyny została zaobserwowana wyłącznie w grupie otrzymującej ten lek w dawce 30 mg/kg po 1 h od podania w pierwszym dniu eksperymentu ($P<0.001$, Rycina 35A).

W teście von Freya podanie oksaliplatyny wywołało rozwój nadwrażliwości mechanicznej pierwszego dnia eksperymentu we wszystkich grupach eksperymentalnych ($P<0.0001$, Rycina 35B). W siódmym dniu eksperymentu pomiary wykonane przed podaniem duloksetyny były istotnie statystycznie obniżone w stosunku do pomiaru uzyskanego od zwierząt, które nie otrzymały oksaliplatyny ($P<0.01$, Rycina 35B), z wyjątkiem grupy, która otrzymała duloksetynę w dawce 30 mg/kg, a pomiar wykonywano po 1 h od podania leku.

Działanie łagodzące objawy nadwrażliwości na bodźce mechaniczne zostało zaobserwowane pierwszego dnia eksperymentu po 1 h od podania duloksetyny dla grup otrzymujących ten lek zarówno w dawce 10 mg/kg ($P<0.001$, Rycina 35B) i 30 mg/kg ($P<0.0001$, Rycina 35B) oraz w siódmym dniu eksperymentu w grupie, która otrzymała duloksetynę w dawce 10 mg/kg, a pomiar wykonano po 12 h od podania leku ($P<0.01$, Rycina 35B).

Rycina 35. Wpływ duloksetyny (10 i 30 mg/kg, *i.p.*) po 1 h, 4 h, 6 h i 12 h od podania na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla $n=10$ (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej przed podaniem duloksetyny w odpowiednim punkcie czasowym: ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. OXA – oksaliplatyna, DL – duloksetyna, predrug – pomiar przed podaniem duloksetyny, postdrug – pomiar po podaniu duloksetyny, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu, czas: 0 h – badanie wykonano po 1 h od podania duloksetyny, 4 h – badanie wykonano po 4 h od podania duloksetyny, 6 h – badanie wykonano po 6 h od podania duloksetyny, 12 h – badanie wykonano po 12 h od podania duloksetyny.



4.3.2 Ocena skuteczności przeciwbólowej pregabaliny w połączeniu z ambroksolem

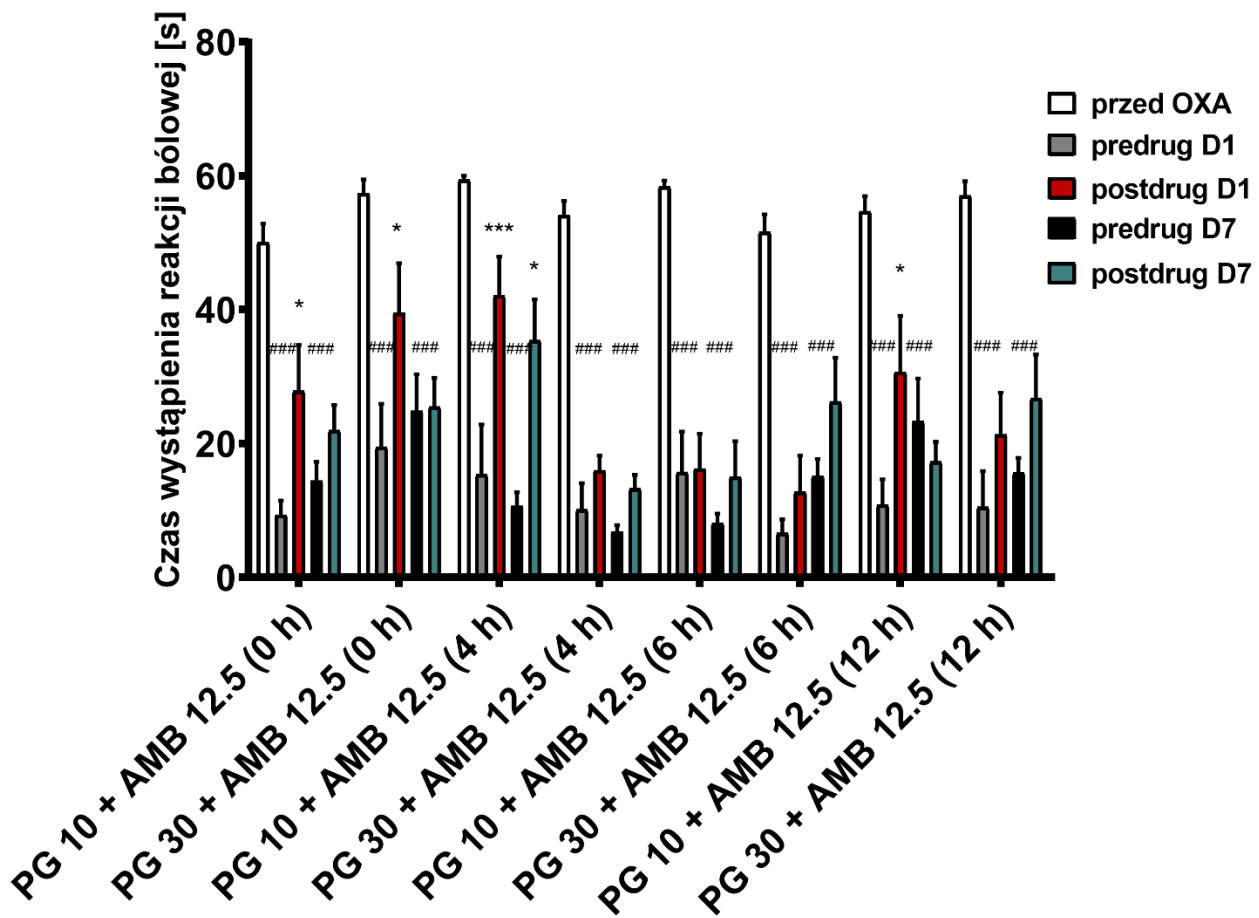
W kolejnym etapie badań została zweryfikowana hipoteza czy podanie skojarzone pregabaliny w dawkach 10 i 30 mg/kg i ambroksolu w dawce 12.5 mg/kg (*i.v.*) działa skuteczniej przeciwbólowo w modelu CIPN, łagodząc objawy nadwrażliwości termicznej silniej niż któryś z tych leków podanych osobno. Analiza statystyczna: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami*: efekt „badanych związków” $F_{7,288}=4.13$, $P<0.001$; efekt „czasu” $F_{4,288}=120.93$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{28,288}=1.72$, $P<0.05$.

Podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej zarówno pierwszego, jak i siódmego dnia eksperymentu we wszystkich grupach eksperymentalnych ($P<0.001$, Rycina 36).

Podanie jednoczesne pregabaliny i ambroksolu wykazało istotny statystycznie efekt przeciwbólowy wyłącznie pierwszego dnia pomiarów, zarówno dla leków podanych w dawkach podprogowych ($P<0.05$, Rycina 36), jak i pregabaliny w dawce 30 mg/kg i ambroksolu w dawce 12.5 mg/kg ($P<0.05$, Rycina 36). Analiza statystyczna wykazała najsilniejszy efekt przeciwbólowy dla zastosowanego połączenia pregabaliny w dawce 10 mg/kg oraz ambroksolu w dawce 12.5 mg/kg przebadanych po 4 h od podania pregabaliny zarówno w pierwszym ($P<0.001$, Rycina 36), jak i siódmym dniu testu ($P<0.05$, Rycina 36). Co więcej, istotny statystycznie efekt analgetyczny został zaobserwowany dla identycznych dawek leków przebadanych po 12 h od podania pierwszego leku jedynie pierwszego dnia eksperymentu ($P<0.05$, Rycina 36). Interesujący wydaje się fakt, iż w obu przypadkach działanie analgetyczne zostało oznaczone wyłącznie dla połączenia dwóch podprogowych dawek leków, a zastosowanie wyższej dawki pregabaliny (30 mg/kg) i podprogowej dawki ambroksolu (12.5 mg/kg) w identycznych przedziałach czasowych nie wykazało istotnego efektu przeciwbólowego i łagodzenia objawów nadwrażliwości.

Wyniki niniejszego eksperymentu opublikowano w pracy: Furgała, A., Fijałkowski, Ł., Nowaczyk, A., Sałat, R., & Sałat, K. (2018). Time-shifted co-administration of sub-analgesic doses of ambroxol and pregabalin attenuates oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 930-940.

Test zimnej płytki (skojarzone podanie pregabaliny i ambroksolu)



Rycina 36. Wpływ pregabaliny (10 i 30 mg/kg, *i.p.*) w połączeniu z ambroksolem (12.5 mg/kg, *i.v.*) podawanych w schemacie CDT na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki.

Nadwrażliwość termiczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) dla $n=10$ (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Bonferroniego. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ### $P<0.001$; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej przed podaniem leków: pregabaliny i ambroksolu w odpowiednim punkcie czasowym: * $P<0.05$, *** $P<0.001$. OXA – oksaliplatyna, PG – pregabalina, AMB – ambroksol, predrug – pomiar przed podaniem związków, postdrug – pomiar po podaniu związków, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu, czas: 0 h – podanie jednoczesne związków (badanie aktywności analgetycznej wykonano po 1 h od podania pregabaliny i 0.5 h po daniu ambroksolu), 4 h – badanie wykonano po 4 h od podania pierwszego leku, 6 h – badanie wykonano po 6 h od podania pierwszego leku, 12 h – badanie wykonano po 12 h od podania pierwszego leku.

4.3.2.1 Ocena skuteczności przeciwbólowej pregabaliny i ambroksolu po 0.5/1 h, 4 h, 6 h i 12 h od podania

Dodatkowo w celu oceny, czy zaobserwowana skuteczność zastosowanego połączenia leków nie wynika z rozwijającego się w czasie efektu przeciwbólowego pojedynczego związku, oceniona została aktywność analgetyczna pregabaliny i ambroksolu w zastosowanych w eksperymencie przedziałach czasowych. Z uwagi na fakt, iż we wcześniejszym badaniu najwyższą skuteczność wykazały połączenia pregabaliny w dawce 10 mg/kg oraz w celu ograniczenia liczby wykorzystanych do badań zwierząt, w niniejszym badaniu pomiar aktywności pregabaliny wykonano wyłącznie dla pregabaliny w dawce podprogowej.

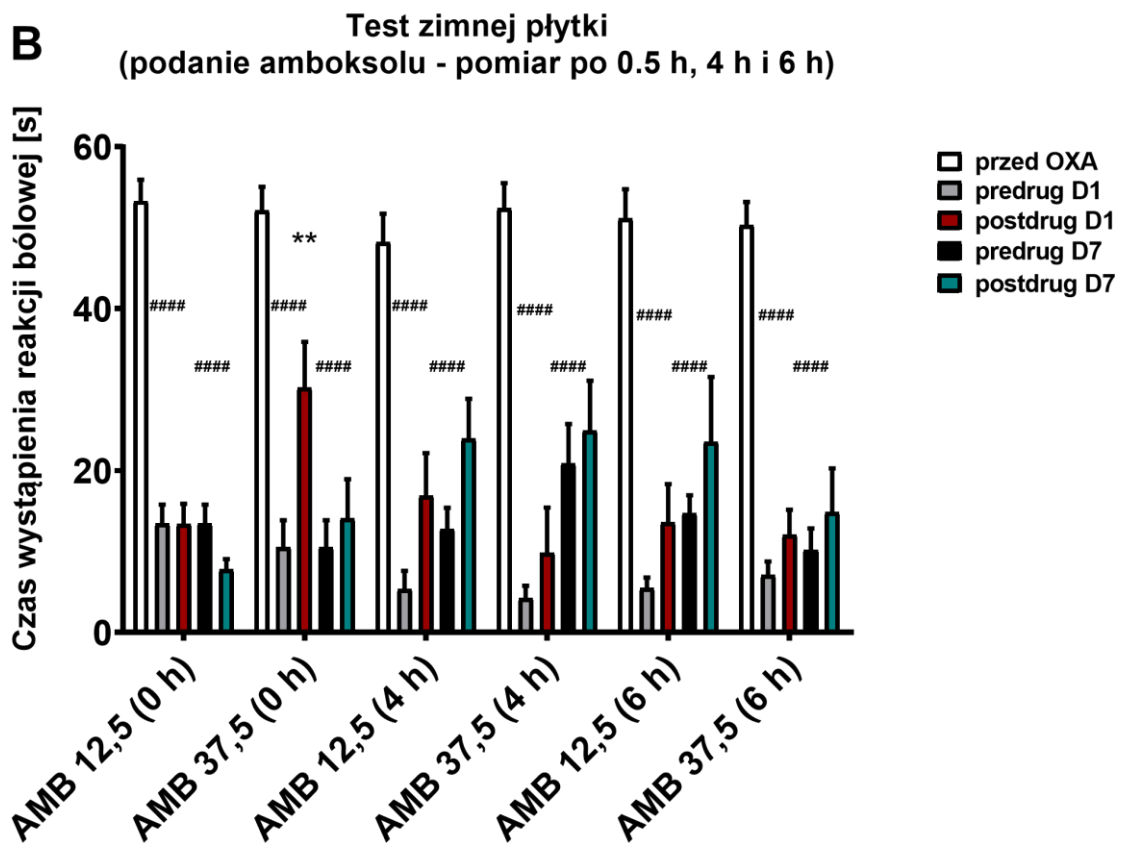
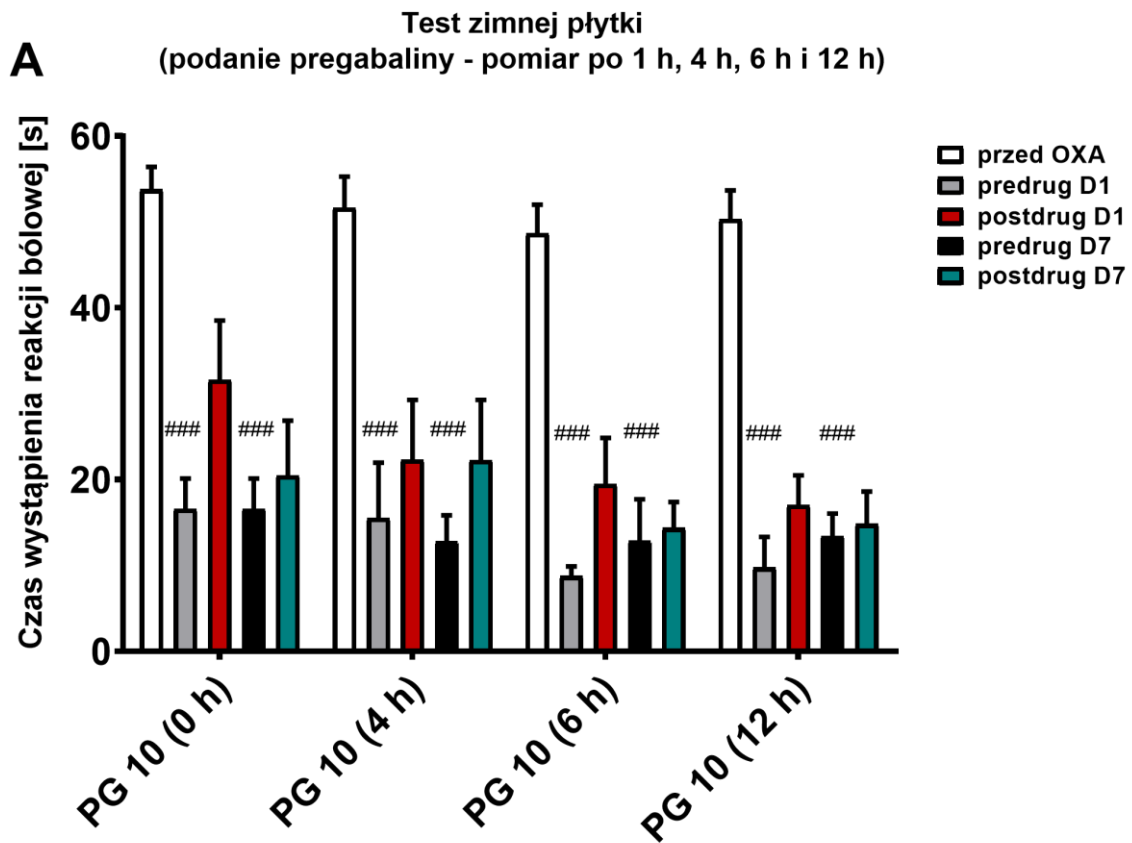
Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzanimi pomiarami; dla pregabaliny: efekt „badanego związku”* $F_{4,135}=76.16, P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3,135}=2.39, P>0.05$; *efekt interakcji* $F_{12,135}=0.26, P>0.05$; *dla ambroksolu: efekt „badanego związku”* $F_{5,54}=0.54, P>0.05$; *efekt „czasu”* $F_{4,216}=134.81, P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{20,216}=2.30, P<0.01$.

W obu eksperymentach podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie obniżenie progu bólowego pierwszego i siódmego dnia pomiarów ($P<0.001$ w przypadku podania pregabaliny; $P<0.0001$ w przypadku podania ambroksolu, Rycina 37).

W teście zimnej płytki pregabalina w dawce 10 mg/kg, nie wykazała istotnej statystycznie aktywności przeciwbólowej w żadnym z przedziałów czasowych (Rycina 37A). W przypadku ambroksolu działanie przeciwbólowe zostało ocenione zarówno dla dawki efektywnej – 37.5 mg/kg oraz dawki podprogowej – 12.5 mg/kg. Aktywność przeciwbólową wykazał wyłącznie ambroksol w dawce 37.5 mg/kg po 30 minutach od podania dożylnego w pierwszym dniu eksperymentu ($P<0.01$, Rycina 37B).

Rycina 37. Wpływ pregabaliny (10 mg/kg, *i.p.*, A) oraz ambroksolu (12.5 i 37.5 mg/kg, *i.v.*, B) po 0.5/1 h, 4 h, 6 h i 12 h od podania na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki.

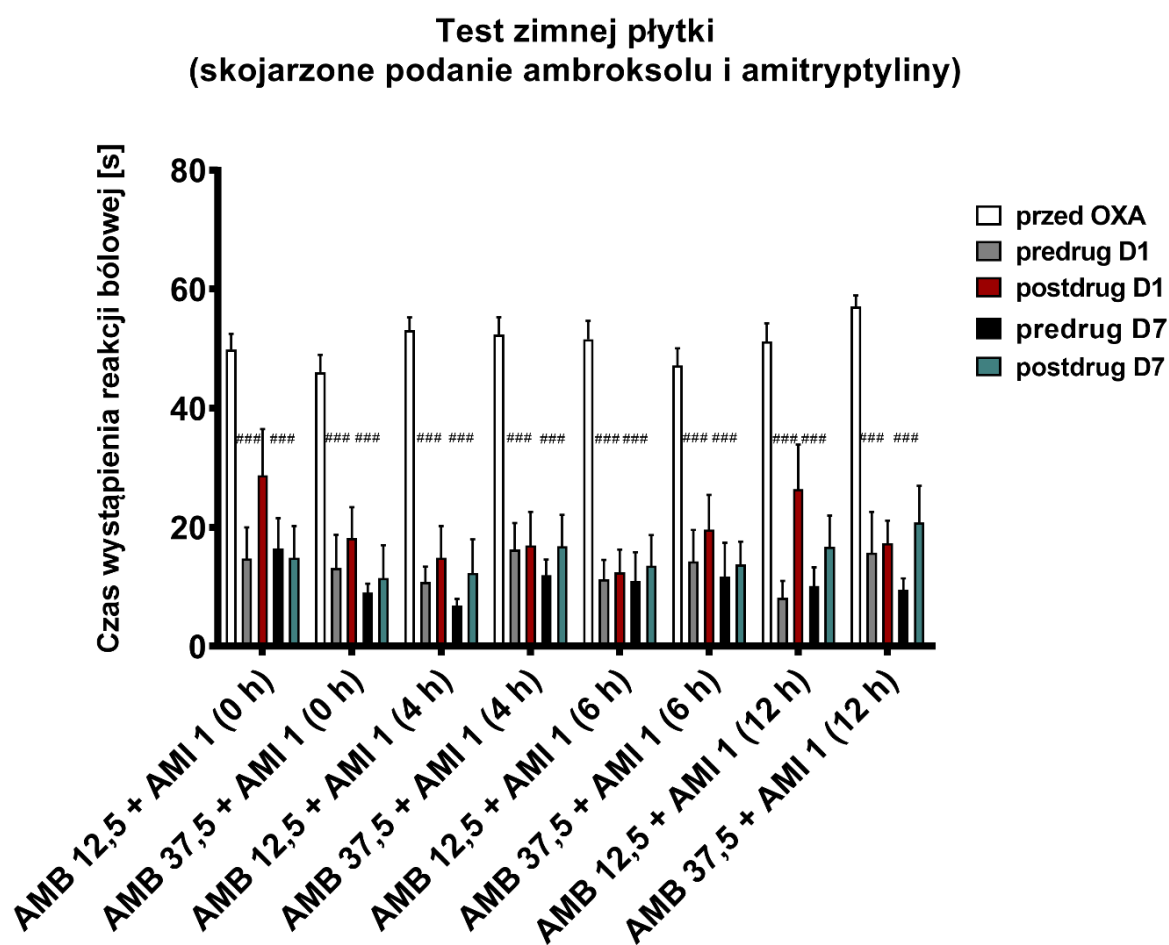
Nadwrażliwość termiczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) dla $n=10$ (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Bonferroniego. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej przed podaniem leków: pregabaliny i ambroksolu w odpowiednim punkcie czasowym: ** $P<0.01$. OXA – oksaliplatyna, PG – pregabalina, AMB – ambroksol, predrug – pomiar przed podaniem związków, postdrug – pomiar po podaniu związków, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu, czas: 0 h – badanie wykonano po 1 h od podania pregabaliny i 0.5 h od podania ambroksolu, 4 h – badanie wykonano po 4 h od podania związków, 6 h – badanie wykonano po 6 h od podania związków, 12 h – badanie wykonano po 12 h od podania związków.



4.3.3 Ocena skuteczności przeciwbólowej ambroksolu w połączeniu z amitryptyliną

W niniejszym badaniu oznaczono wpływ podania skojarzonego ambroksolu w dawkach 12.5 i 37.5 mg/kg w połączeniu z amitryptyliną w dawce 1 mg/kg na zdolność łagodzenia objawów nadwrażliwości termicznej wywołanej podaniem oksaliplatyny. Test zimnej płytki: analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanych związków” $F_{7,72}=0.8955$, $P>0.05$; efekt „czasu” $F_{4,288}=110.2$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{28,288}=0.575$, $P>0.05$.

Podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej zarówno pierwszego, jak i siódmego dnia eksperymentu ($P<0.001$, Rycina 38). Podanie skojarzone ambroksolu i amitryptyliny nie wykazało działania przeciwbólowego w żadnym z zastosowanych połączeń.



Rycina 38. Wpływ ambroksolu (12.5 i 37.5 mg/kg, *i.v.*) w połączeniu z amitryptyliną (1 mg/kg, *i.p.*) podawanych w schemacie CDT na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki.

Nadwrażliwość termiczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) dla $n=10$ (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami i test *post hoc* Bonferroni. Znamiennosć statystyczna vs. pomiar przed podaniem związków: ### $P<0.001$. OXA – oksaliplatyna, AMB – ambroksol, AMI – amitryptylina, predrug – pomiar przed podaniem związków, postdrug – pomiar po podaniu związków, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu, czas: 0 h – podanie jednoczesne związków (badanie aktywności analgetycznej wykonano po 1 h od podania leków), 4 h – badanie wykonano po 4 h od podania pierwszego leku, 6 h – badanie wykonano po 6 h od podania pierwszego leku, 12 h – badanie wykonano po 12 h od podania pierwszego leku.

4.3.4 Ocena skuteczności przeciwbólowej lakoamidu w połączeniu z ambroksolem

Z uwagi na fakt, iż hamowanie VGSCs stanowi ważny mechanizm odpowiedzialny za łagodzenie objawów CIPN indukowanej oksaliplatyną, sprawdzono, czy jednoczesne oddziaływanie na te kanały poprzez selektywne wzmacnianie powolnej dezaktywacji VGSCs prezentowane przez lakoamid oraz hamowanie VGSCs przez ambroksol wykaże addytywny efekt przeciwbólowy w zwierzęcym modelu CIPN. W tym celu podawano lakoamid w dawkach 10 i 30 mg/kg w połączeniu z ambroksolem w dawce 90 mg/kg.

Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{8,81}=26.99$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3,214,260.3} = 201.7$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{32,324}=4.097$, $P<0.0001$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{8,81}=35.57$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3,201,259.3}=392.9$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{32,324}=6.625$, $P<0.0001$.

W teście zimnej płytki jednorazowe podanie oksaliplatyny wywołało znamienne skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej we wszystkich grupach eksperymentalnych w pierwszym dniu testu ($P<0.05$, Rycina 39A). Efekt ten utrzymał się do dnia siódmego powodując istotne statystycznie obniżenie progu bólowego przed podaniem leków ($P<0.01$, Rycina 39A). Spośród przebadanych różnych wariantów połączeń lakoamidu i ambroksolu, w żadnym z zastosowanych schematów podań nie wykazano istotnej statystycznie skuteczności analgetycznej skojarzonego podania lakoamidu i ambroksolu, zarówno w pierwszym, jak i siódmym dniu eksperymentu w teście zimnej płytki (Rycina 39A).

W celu uproszczenia opisu i ułatwienia interpretacji niniejszych wyników zastosowano skrótowe oznaczenia podania skojarzonego leków. Przedział czasu [4 h] – oznacza pomiar wykonany po 4 h od podania pierwszego leku, w tym przypadku lakoamidu; [6 h] – oznacza pomiar wykonany po 6 h od podania pierwszego leku; [12 h] – oznacza pomiar wykonany po 12 h od podania pierwszego leku.

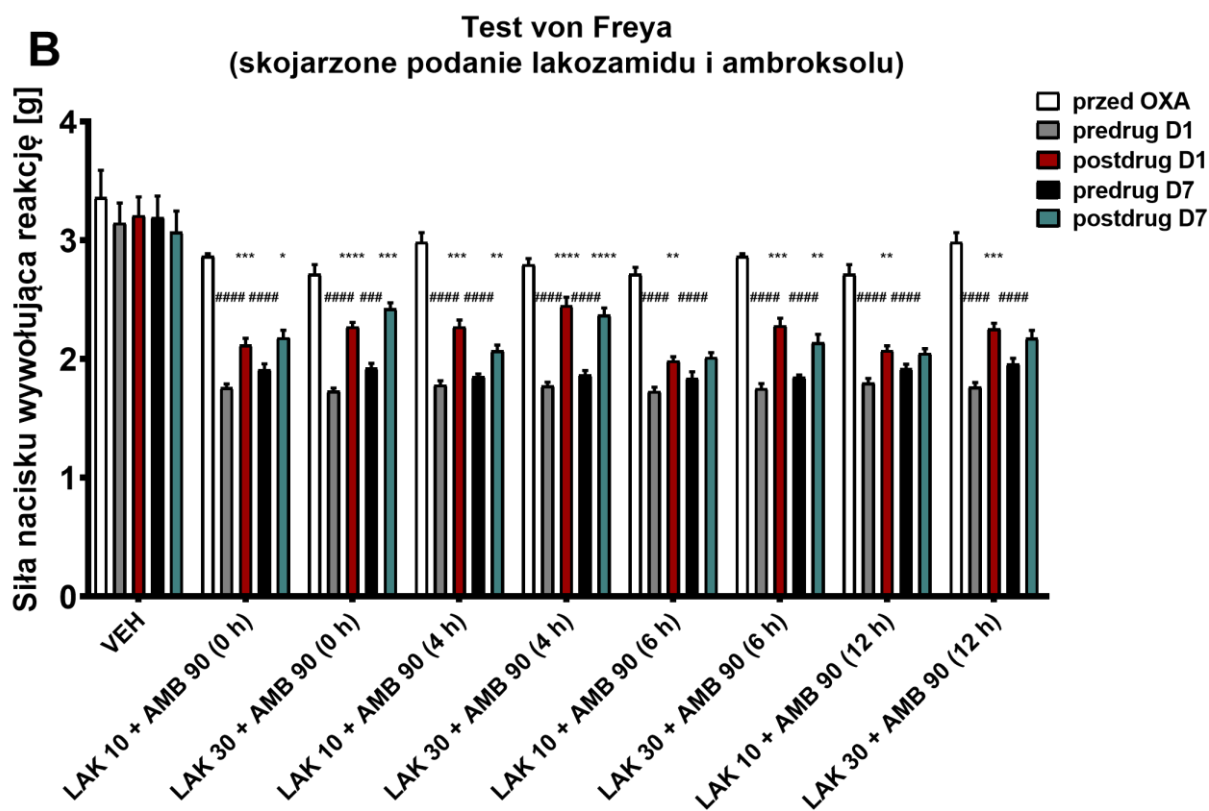
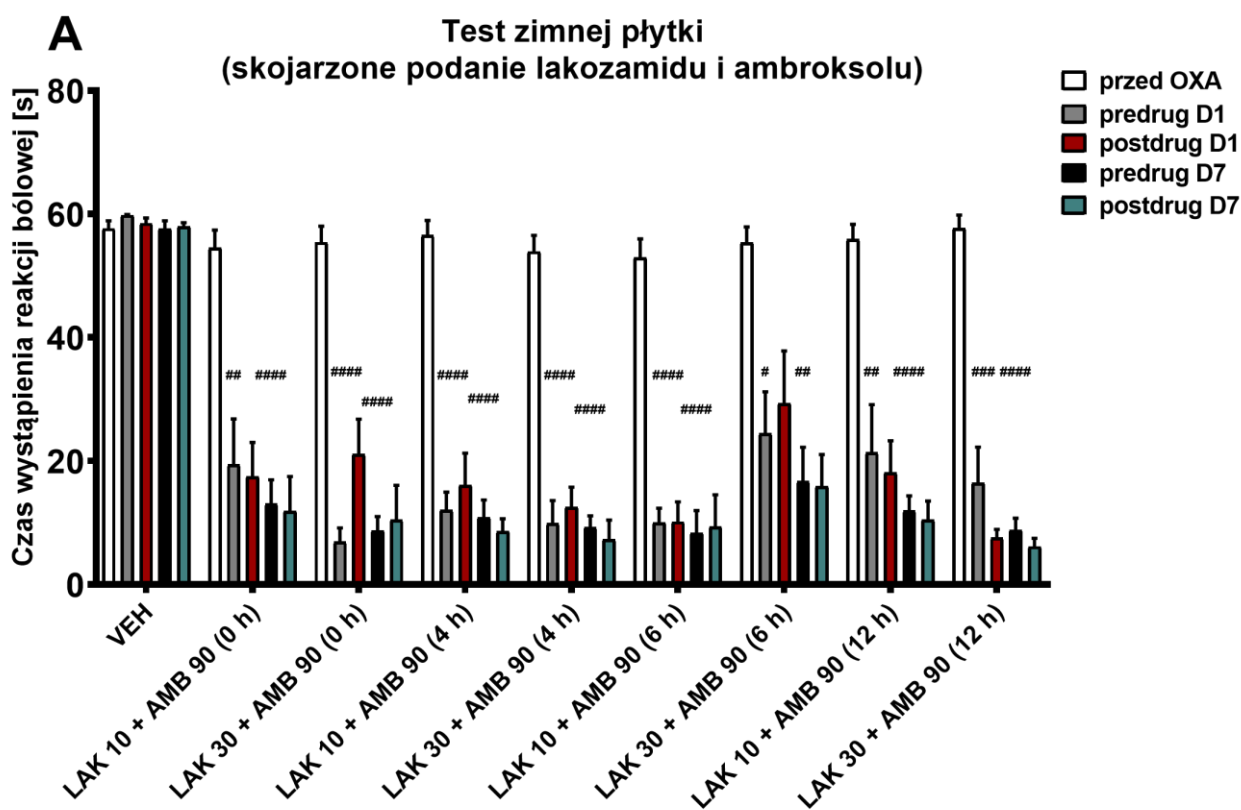
W teście von Freya podanie oksaliplatyny spowodowało istotne statystycznie obniżenie siły nacisku wywołującej reakcję bólową u myszy pierwszego ($P<0.0001$, Rycina 39B) i siódmego dnia eksperymentu ($P<0.001$, Rycina 39B) w stosunku do pomiaru uzyskanego dla myszy, które nie otrzymały oksaliplatyny. W pierwszym dniu eksperymentu znaczące podwyższenie progu bólowego w odpowiedzi na działanie bodźca mechanicznego zostało zaobserwowane we wszystkich grupach eksperymentalnych, przy czym najsilniejszy efekt wystąpił w grupie otrzymującej lakoamid w dawce 30 mg/kg i ambroksol w dawce 90 mg/kg podawanych jednocześnie oraz w przedziale czasowym [4 h] ($P<0.0001$, Rycina 39B). Słabszy efekt przeciwbólowy został zaobserwowany w grupie otrzymującej lakoamid w dawce 10 mg/kg i ambroksol w dawce 90 mg/kg podawanych jednocześnie i w przedziale czasowym [4 h] oraz lakoamid w dawce 30 mg/kg i ambroksol w dawce 90 mg/kg w przedziale czasowym [6 h] i [12 h] ($P<0.001$, Rycina 39B). Najsłabszy efekt przeciwbólowy wykazało podanie lakoamidu w dawce 10 mg/kg w połączeniu z ambroksolem w dawce 90 mg/kg w przedziale czasowym [6 h] i [12 h] na nadwrażliwość mechaniczną w pierwszym dniu eksperymentu ($P<0.01$, Rycina 39B).

W siódmym dniu eksperymentu podanie skojarzone lakoamidu z ambroksolem wykazało nieco słabszy efekt przeciwbólowy na objawy nadwrażliwości mechanicznej niż w pierwszym dniu eksperymentu. Najsilniejszy efekt łagodzący objawy bólowe wykazało

połączenie lakozamidu w dawce 30 mg/kg i ambroksolu w dawce 90 mg/kg w przedziale czasowym [4 h] ($P < 0.0001$, Rycina 39B) oraz jednocześnie ($P < 0.001$, Rycina 39B). Słabszy efekt wykazało połączenie lakozamidu w dawce 10 mg/kg i ambroksolu w dawce 90 mg/kg w przedziale czasowym [4 h] oraz lakozamid w dawce 30 mg/kg i ambroksol w dawce 90 mg/kg w przedziale czasowym [6 h] ($P < 0.01$, Rycina 39B). Najśłabszy efekt analgetyczny w siódmym dniu pomiarów wykazało podanie lakozamidu w dawce 10 mg/kg i ambroksol w dawce 90 mg/kg podanych jednocześnie ($P < 0.05$, Rycina 39B). Podanie lakozamidu z ambroksolem w obu wariantach dawek w przedziale czasowym [12 h] oraz połączenia podprogowych dawek lakozamidu i ambroksolu w przedziale czasowym [6 h] nie wykazało działania analgetycznego w siódmym dniu eksperymentu w teście von Freya.

Rycina 39. Wpływ lakozamidu (10 i 30 mg/kg, *i.p.*) w połączeniu z ambroksolem (90 mg/kg, *i.p.*) podawanych w schemacie CDT na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla $n=10$ (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły wywołującej reakcję bólową przed podaniem leków: lakozamidu i ambroksolu w odpowiednim punkcie czasowym: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. OXA – oksaliplatyna, LAK – lakozamid, AMB – ambroksol, predrug – pomiar przed podaniem związków, postdrug – pomiar po podaniu związków, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu, czas: 0 h – podanie jednoczesne związków (badanie aktywności analgetycznej wykonano po 1 h od podania leków), 4 h – badanie wykonano po 4 h od podania pierwszego leku, 6 h – badanie wykonano po 6 h od podania pierwszego leku, 12 h – badanie wykonano po 12 h od podania pierwszego leku. Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.



4.3.5 Ocena skuteczności przeciwbólowej pregabaliny w połączeniu z lakoamidem

W oparciu o wyniki badań otrzymane we wcześniejszych doświadczeniach oraz dane literaturowe potwierdzające istotny wpływ hamowania VGSCs i VGCCs na łagodzenie objawów bólu neuropatycznego o różnej etiologii, oceniono skuteczność podania skojarzonego pregabaliny i lakoamidem w zwierzęcym modelu CIPN indukowanej oksaliplatyną. W tym celu podawano pregabalinę w dawkach 10 i 30 mg/kg w połączeniu z lakoamidem w dawce 10 mg/kg.

Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzanimi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{8,81}=17.21$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3,432,278} = 144.2$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{32,324}=3.393$, $P<0.0001$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzanimi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{8,81}=30.95$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3,354,271.7}=367.6$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{32,324}=13.37$, $P<0.0001$.

W teście zimnej płytki podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na bodziec termiczny w pierwszym dniu eksperymentu we wszystkich grupach eksperymentalnych ($P<0.01$, Rycina 40A). Zmiany utrzymywały się do siódmego dnia pomiarów, znamienne obniżając próg bólowy zwierząt ($P<0.01$, Rycina 40A). Spośród przebadanych połączeń pregabaliny i lakoamidem podanych w różnych wariantach czasowych, istotną statystycznie aktywność przeciwbólową w teście zimnej płytki wykazało wyłącznie podanie pregabaliny w dawce 30 mg/kg jednocześnie z lakoamidem w dawce 10 mg/kg pierwszego dnia eksperymentu ($P<0.05$, Rycina 40A).

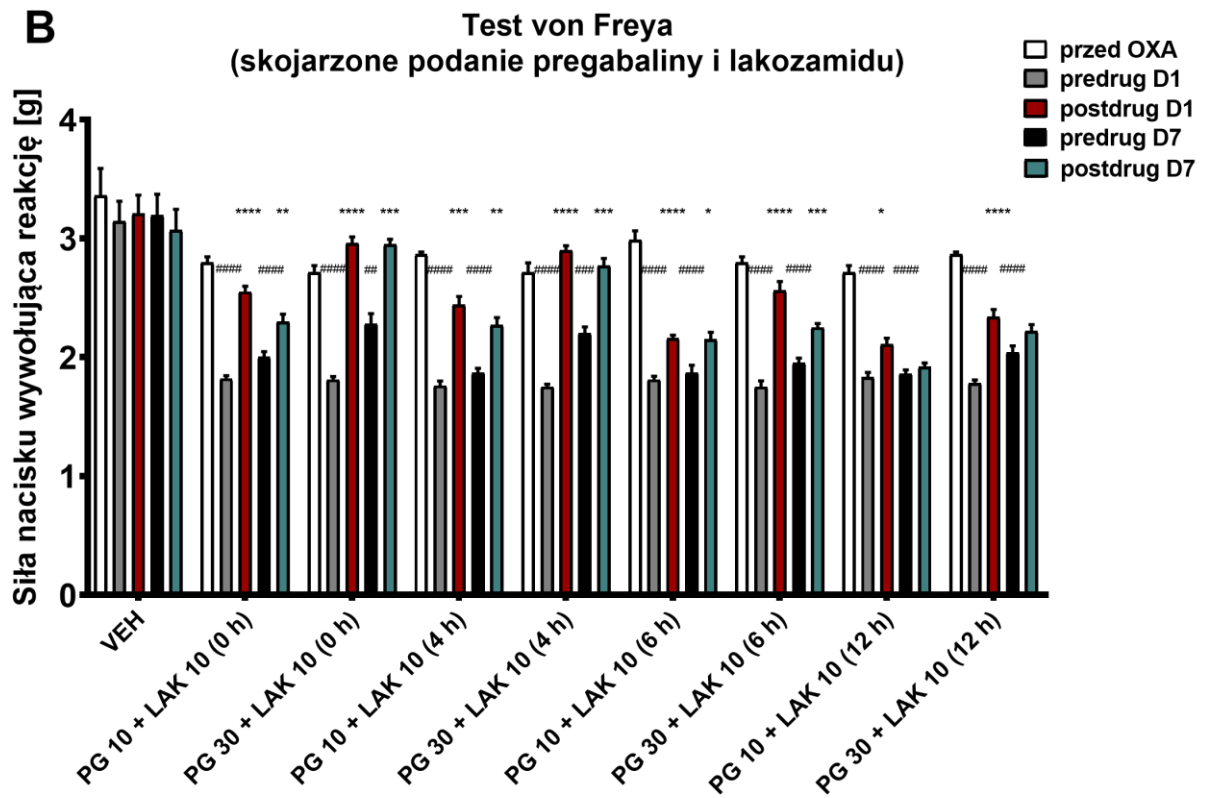
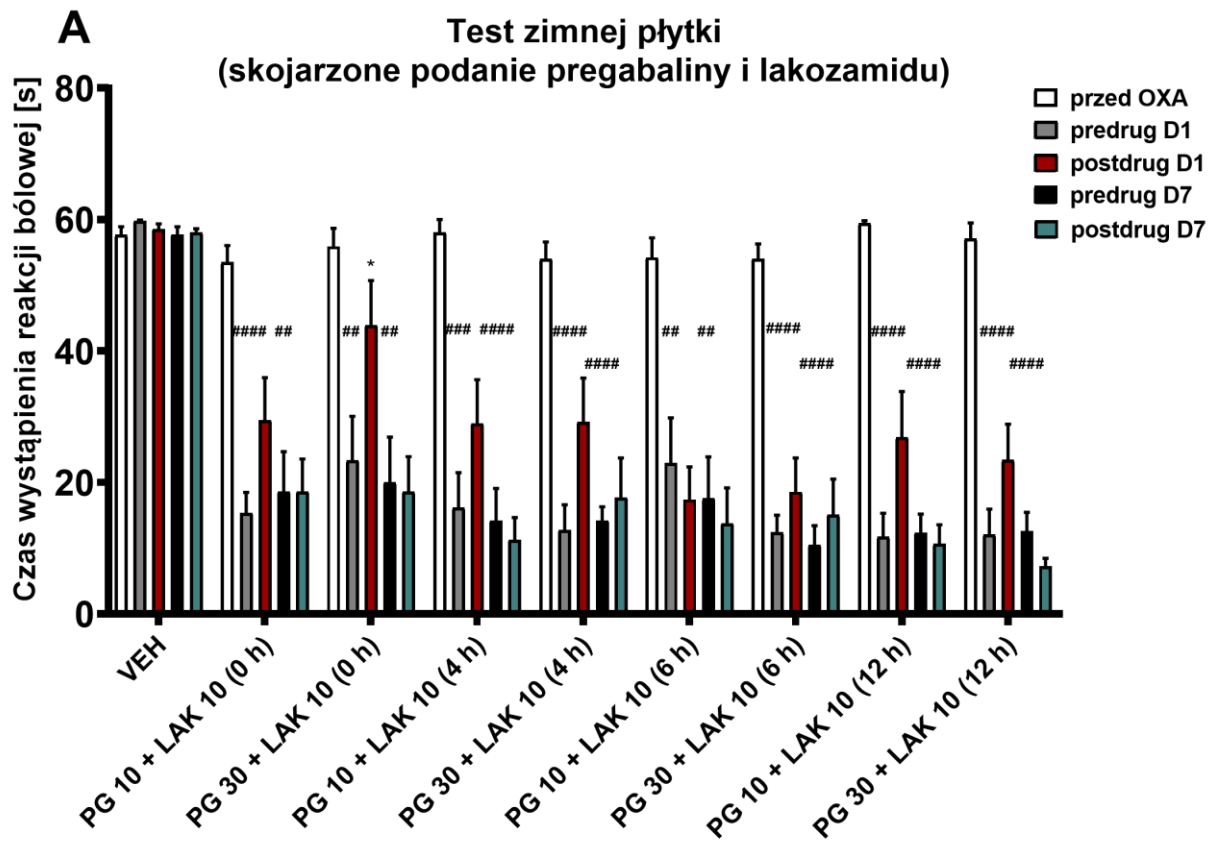
W celu uproszczenia opisu i ułatwienia interpretacji niniejszych wyników zastosowano skrótowe oznaczenia podania skojarzonego leków. Przedział czasu [4 h] – oznacza pomiar wykonany po 4 h od podania pierwszego leku, w tym przypadku pregabaliny; [6 h] – oznacza pomiar wykonany po 6 h od podania pierwszego leku; [12 h] – oznacza pomiar wykonany po 12 h od podania pierwszego leku.

W teście von Freya jednorazowe podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie obniżenie siły nacisku wywołującej reakcję bólową u zwierząt badaną w pierwszym dniu eksperymentu we wszystkich grupach eksperymentalnych ($P<0.0001$, Rycina 40B). Podobny efekt zaobserwowano w siódmym dniu pomiarów ($P<0.01$, Rycina 40B).

Skojarzone podanie pregabaliny i lakoamidem w teście von Freya wykazało istotne statystycznie działanie analgetyczne, podwyższając próg bólowy w odpowiedzi na działający bodziec mechaniczny w pierwszym dniu eksperymentu we wszystkich grupach eksperymentalnych ($P<0.0001$, z wyjątkiem podania skojarzonego: pregabaliny w dawce 10 mg/kg i lakoamidem w dawce 10 mg/kg w przedziale czasowym [4 h]: $P<0.001$ oraz [12 h]: $P<0.05$, Rycina 40B). Co więcej, podanie połączeń pregabaliny i lakoamidem w siódmym dniu eksperymentu wykazało silny i istotny statystycznie wpływ na nadwrażliwość mechaniczną ($P<0.05$, podanie pregabaliny w dawce 10 mg/kg i lakoamidem w dawce 10 mg/kg w przedziale czasowym [6 h]; $P<0.01$, podanie pregabaliny w dawce 10 mg/kg i lakoamidem w dawce 10 mg/kg podanych jednocześnie i w przedziale czasowym [4 h]; $P<0.001$, podanie pregabaliny w dawce 30 mg/kg i lakoamidem w dawce 10 mg/kg podanych jednocześnie i w przedziale czasowym [4 h] i [6 h], Rycina 40B) z wyjątkiem grup z zastosowanym przedziałem czasowym [12 h], które nie wykazały aktywności przeciwbólowej.

Rycina 40. Wpływ pregabaliny (10 i 30 mg/kg, *i.p.*) w połączeniu z lakoamidem (10 mg/kg, *i.p.*) podawanych w schemacie CDT na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla n=10 (± SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ## P<0.01, ### P<0.001, #### P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły wywołującej reakcję bólową przed podaniem związków w odpowiednim punkcie czasowym: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001. OXA – oksaliplatyna, PG – pregabalina, LAK – lakoamid, predrug – pomiar przed podaniem związków, postdrug – pomiar po podaniu związków, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu, czas: 0 h – podanie jednoczesne związków (badanie aktywności analgetycznej wykonano po 1 h od podania leków), 4 h – badanie wykonano po 4 h od podania pierwszego leku, 6 h – badanie wykonano po 6 h od podania pierwszego leku, 12 h – badanie wykonano po 12 od podania pierwszego leku. Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.



4.3.6 Ocena skuteczności przeciwbólowej aripirazolu w połączeniu z ceftriaksonem podawanych jednorazowo i wielokrotnie

W ramach kolejnego etapu badań zbadano czy ceftriakson poprzez zwiększenie ekspresji GLT-1 oraz aripirazol – modulator transmisji dopaminergicznej i serotonergicznej mogą działać synergistycznie przeciwbólowo w modelu CIPN wywołanej oksaliplatyną. W ramach eksperymentu leki zostały podane jednocześnie jednorazowo i wielokrotnie. Skuteczność analgetyczną oceniono w teście zimnej płytki oraz teście von Freya.

Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{14,131}=1.574$, $P>0.05$; *efekt „czasu”* $F_{4,524}=243.1$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{56,524}=2.006$, $P<0.0001$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{10,95}=14.03$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{4,380}=339.4$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{40,380}=7.843$, $P<0.0001$.

W teście zimnej płytki jednorazowe podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na działający bodziec termiczny pierwszego i siódmego dnia eksperymentu we wszystkich grupach eksperymentalnych ($P<0.0001$, Rycina 41A). Istotny efekt przeciwbólowy zastosowanego połączenia leków zaobserwowano wyłącznie w grupie otrzymującej aripirazol w dawce 10 mg/kg oraz ceftriakson w dawce 50 mg/kg w pierwszym dniu eksperymentu (grupa otrzymująca leki wielokrotnie: $P<0.05$, Rycina 41A).

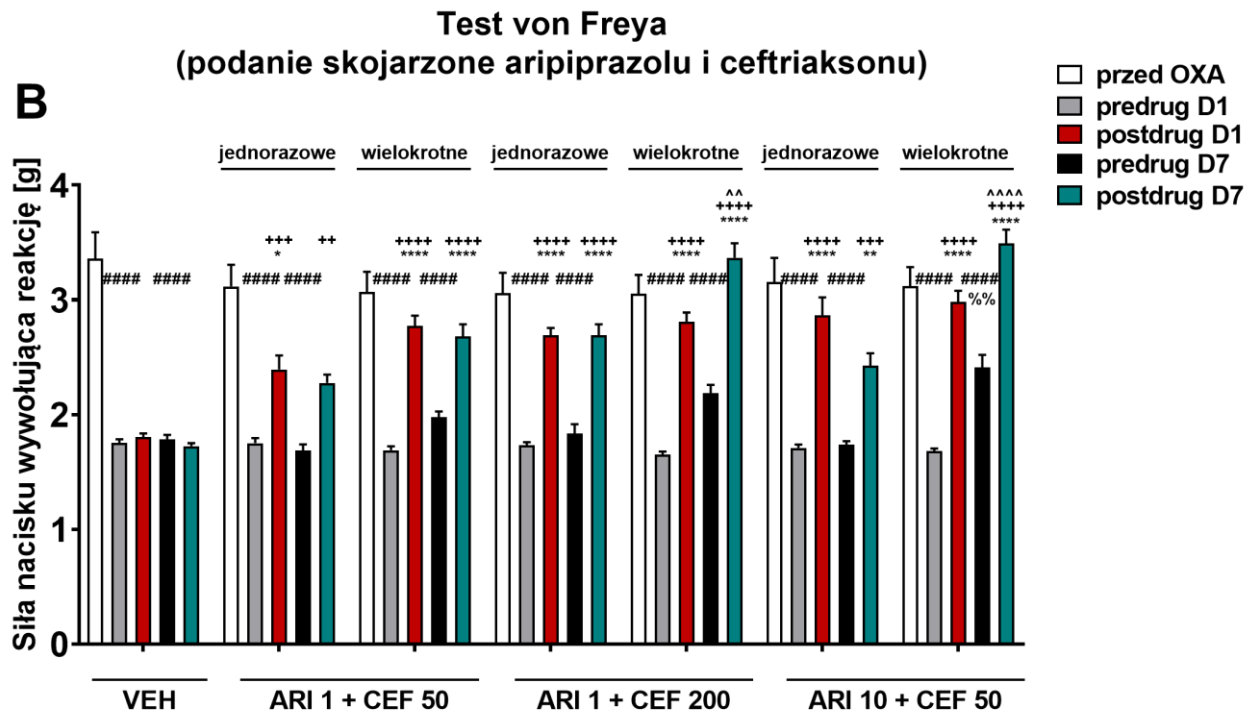
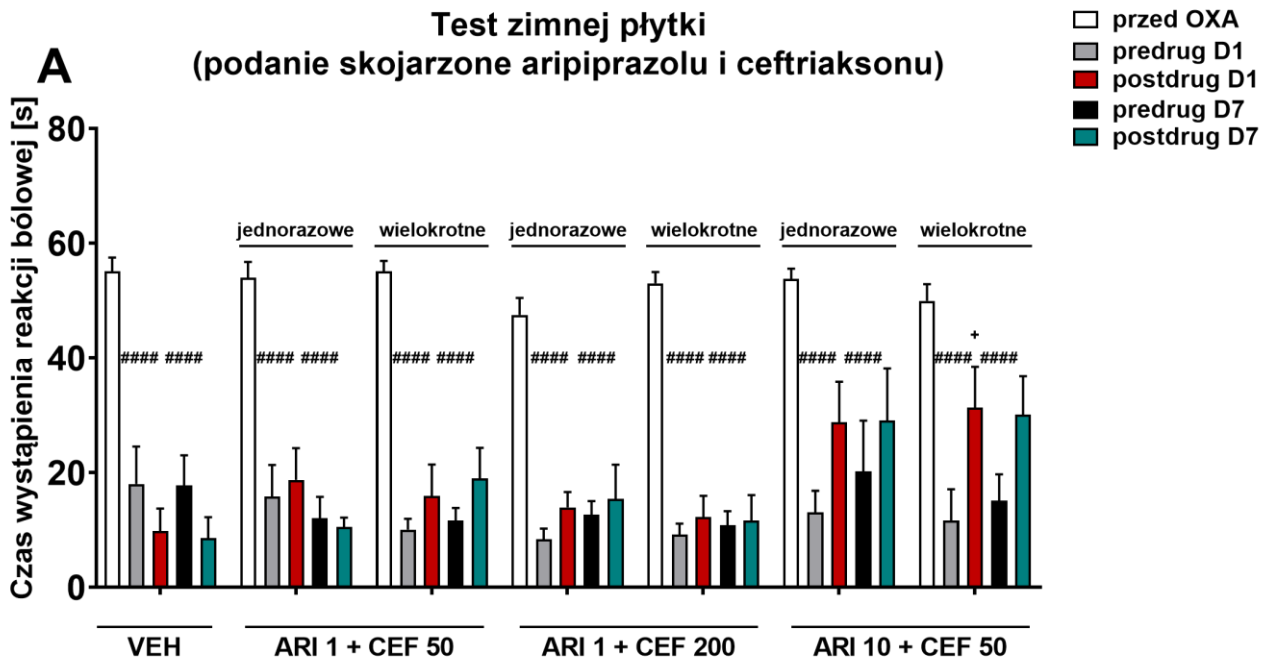
W teście von Freya podanie oksaliplatyny istotnie statystycznie obniżyło próg bólowy pierwszego i siódmego dnia eksperymentu we wszystkich grupach eksperymentalnych ($P<0.0001$, Rycina 41B). Podanie skojarzone aripirazolu i ceftriaksonu w różnych dawkach i wariantach połączeń wywołało istotny statystycznie efekt na nadwrażliwość mechaniczną w pierwszym i siódmym dniu eksperymentu we wszystkich grupach eksperymentalnych w porównaniu do pomiarów przed podaniem leków ($P<0.01$, Rycina 41B). Dodatkowo pomiary te były istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do odpowiadających pomiarów grupy kontrolnej ($P<0.01$, Rycina 41B), oprócz jednorazowego podania aripirazolu w dawce 1 mg/kg i ceftriaksonu w dawce 50 mg/kg, których podanie wykazało taki efekt wyłącznie pierwszego dnia eksperymentu ($P<0.05$, Rycina 41B).

W grupach otrzymujących wielokrotnie aripirazol w dawce 1 mg/kg i ceftriaksonu w dawce 200 mg/kg oraz aripirazolu w dawce 10 mg/kg i ceftriaksonu w dawce 50 mg/kg, podanie tych połączeń w siódmym dniu wywoływało istotny statystycznie efekt przeciwbólowy, przewyższający odpowiadającą wartość uzyskaną dla podania jednorazowego tych leków ($P<0.01$, Rycina 41B). Ponadto wielokrotne podanie aripirazolu w dawce 10 mg/kg i ceftriaksonu w dawce 50 mg/kg istotnie statystycznie podwyższało wartość pomiaru przed podaniem leków, wykazując potencjalne działanie ochronne na rozwój nadwrażliwości mechanicznej po siedmiu dniach od podania cytostatyka w porównaniu do analogicznego pomiaru grupy otrzymującej leki jednorazowo ($P<0.01$, Rycina 41B),

Wyniki niniejszego eksperymentu opublikowano w pracy: Sałat, K., Furgała, A., & Sałat, R. (2019). Interventional and preventive effects of aripiprazole and ceftriaxone used alone or in combination on oxaliplatin-induced tactile and cold allodynia in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 882-890.

Rycina 41. Wpływ aripiprazolu (1 i 10 mg/kg, *i.p.*) w połączeniu z ceftriaksonem (50 i 200 mg/kg, *i.p.*) podawanych jednorazowo i wielokrotnie na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla n=10 (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Bonferroniego. Znamiennosc statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ##### P<0.0001; znamiennosc statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/sily nacisku wywołujacej reakcje przed podaniem związkow w odpowiednim punkcie czasowym: + P<0.05, ++ P<0.01, +++ P<0.001, ++++ P<0.0001; znamiennosc statystyczna vs. pomiar po podaniu oksaliplatyny grupy kontrolnej: * P<0.05, ** P<0.01, **** P<0.0001; znamiennosc statystyczna vs. pomiar przed podaniem lekow grupy otrzymujacej związki jednorazowo: ^^ P<0.01, ^^ ^^ P<0.0001, znamiennosc statystyczna vs. pomiar przed podaniem lekow grupy otrzymujacej związki jednorazowo: %% P<0.01. OXA – oksaliplatyna, ARI – aripiprazol, CEF – ceftriakson, predrug – pomiar przed podaniem związkow, postdrug – pomiar po podaniu związkow, D1 – pierwszy dzien eksperymentu, D7 – siódmy dzien eksperymentu.



4.3.7 Ocena skuteczności przeciwbólowej simwastatyny w połączeniu z cebranopadolem

W niniejszym eksperymencie oceniono skuteczność podania skojarzonego simwastatyny podawanej wielokrotnie przez siedem dni w połączeniu z cebranopadolem dodatkowo podanym w siódmym dniu eksperymentu. Skuteczność połączeń lekowych oceniono w teście zimnej płytki.

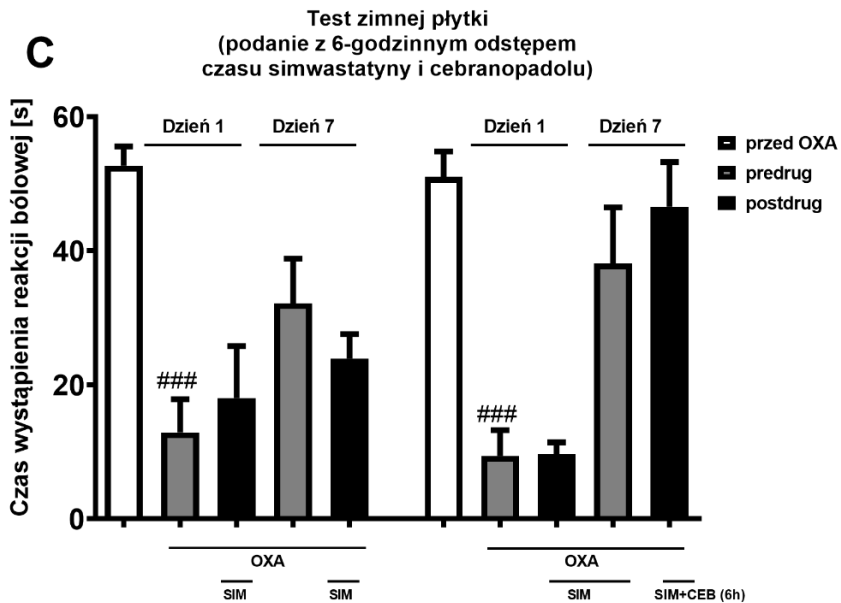
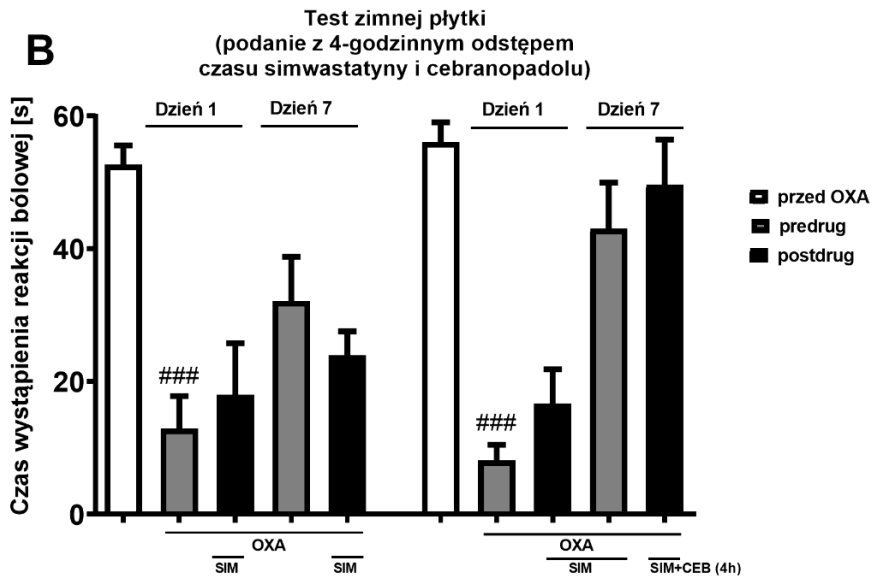
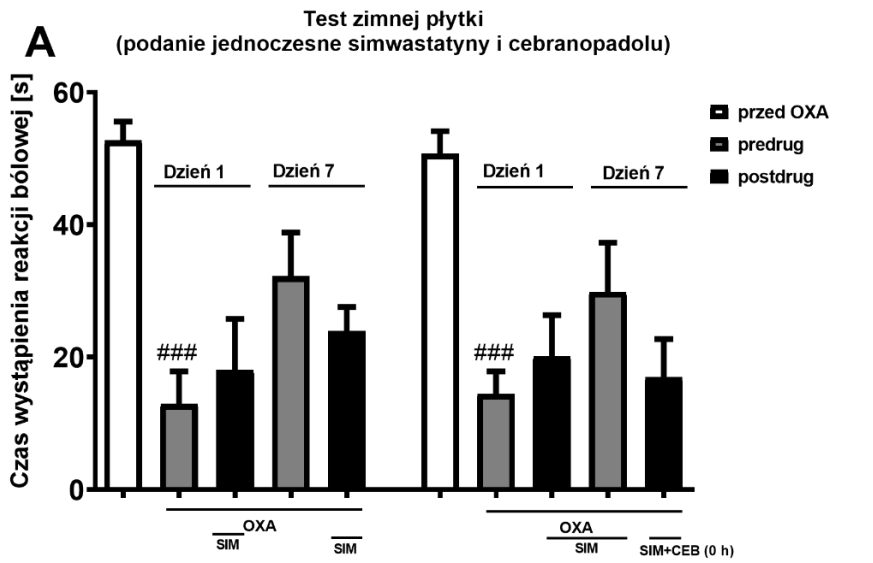
We wszystkich grupach podanie oksaliplatyny powodowało istotne statystycznie obniżenie progu wrażliwości termicznej zaobserwowane w odpowiedzi na działający bodziec termiczny podczas pierwszego dnia eksperymentu ($P < 0.001$, Rycina 42). Pojedyncze podanie simwastatyny prowadziło do nieznacznego wydłużenia czasu wystąpienia reakcji bólowej w teście zimnej płytki, a wartości te nie były istotne statystycznie. Co ciekawe, wielokrotne podanie simwastatyny wywołało znaczne podwyższenie wartości pomiarów przed podaniem leków otrzymanych w siódmym dniu eksperymentu, świadczące o zahamowaniu rozwoju nadwrażliwości termicznej. Otrzymane wartości pomiarów w siódmym dniu eksperymentu były zbliżone do pomiarów otrzymanych dla zwierząt, które nie otrzymały oksaliplatyny (zwierzęta kontrolne, bez neuropatii).

Skuteczność analgetyczna cebranopadolu jako dodatkowej komponenty terapii, mającej na celu łagodzenie objawów nadwrażliwości termicznej, w siódmym dniu eksperymentu nie została wykazana. Podanie cebranopadolu siódmego dnia, zarówno w schemacie podania jednoczesnego (test zimnej płytki: *jednoczynnikowa analiza wariancji*, $F_{9,70}=6.657$, $P < 0.0001$, Rycina 42A) oraz po: 4 h (test zimnej płytki: *jednoczynnikowa analiza wariancji*, $F_{9,65}=11.37$, $P < 0.0001$, Rycina 42B) i 6 h (test zimnej płytki: *jednoczynnikowa analiza wariancji*, $F_{9,65}=9.875$, $P < 0.0001$, Rycina 42C) od podania simwastatyny nie wydłużało istotnie czasu wystąpienia reakcji bólowej w teście zimnej płytki. Brak aktywności zastosowanego połączenia leków można wyjaśnić wysokimi wartościami pomiarów uzyskanymi w siódmym dniu eksperymentu jako efekt wielokrotnego podania simwastatyny, którego dodatkowe podanie cebranopadolu nie było w stanie istotnie podwyższyć.

Wyniki niniejszego eksperymentu opublikowano w pracy: Sałat, K., Furgała, A., & Sałat, R. (2018). Evaluation of cebranopadol, a dually acting nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor agonist in mouse models of acute, tonic, and chemotherapy-induced neuropathic pain. *Inflammopharmacology*, 26(2), 361-374.

Rycina 42. Wpływ wielokrotnego podania simwastatyny (100 mg/kg, p.o.) w połączeniu z cebranopadolem (10 mg/kg, s.c.) przebadanych siódmego dnia eksperymentu: po 2 h od podania jednoczesnego (A), oraz z odstępem czasu 4 h (B) i 6 h (C) na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki.

Nadwrażliwość termiczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny oraz 7 dni po jej podaniu. Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) dla n=10 (± SEM). Analiza statystyczna: jednoczynnikowa analiza wariancji i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ### P<0.001. OXA – oksaliplatyna, SIM – simwastatyna, CEB – cebranopadol, predrug – pomiar przed podaniem związków, postdrug – pomiar po podaniu związków.



4.3.8 Ocena skuteczności przeciwbólowej minocykliny w połączeniu z ambroksolem i duloksetyną

4.3.8.1 Ocena skuteczności przeciwbólowej minocykliny w połączeniu z ambroksolem

W oparciu o mechanizm działania minocykliny oraz udokumentowaną aktywność analgetyczną w różnych modelach bólu, w tym bólu neuropatycznego [130,322,323], oceniono skuteczność przeciwbólową tego leku w połączeniu z ambroksolem. Skuteczność zastosowanego połączenia oceniono w teście zimnej płytki oraz teście von Freya.

Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{7,360}=3.414$, $P<0.01$; *efekt „czasu”* $F_{4,360}=223.6$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{28,360}=1.412$, $P>0.05$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{7,360}=4.195$, $P<0.001$; *efekt „czasu”* $F_{4,360}=291.0$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{28,360}=4.348$, $P<0.0001$.

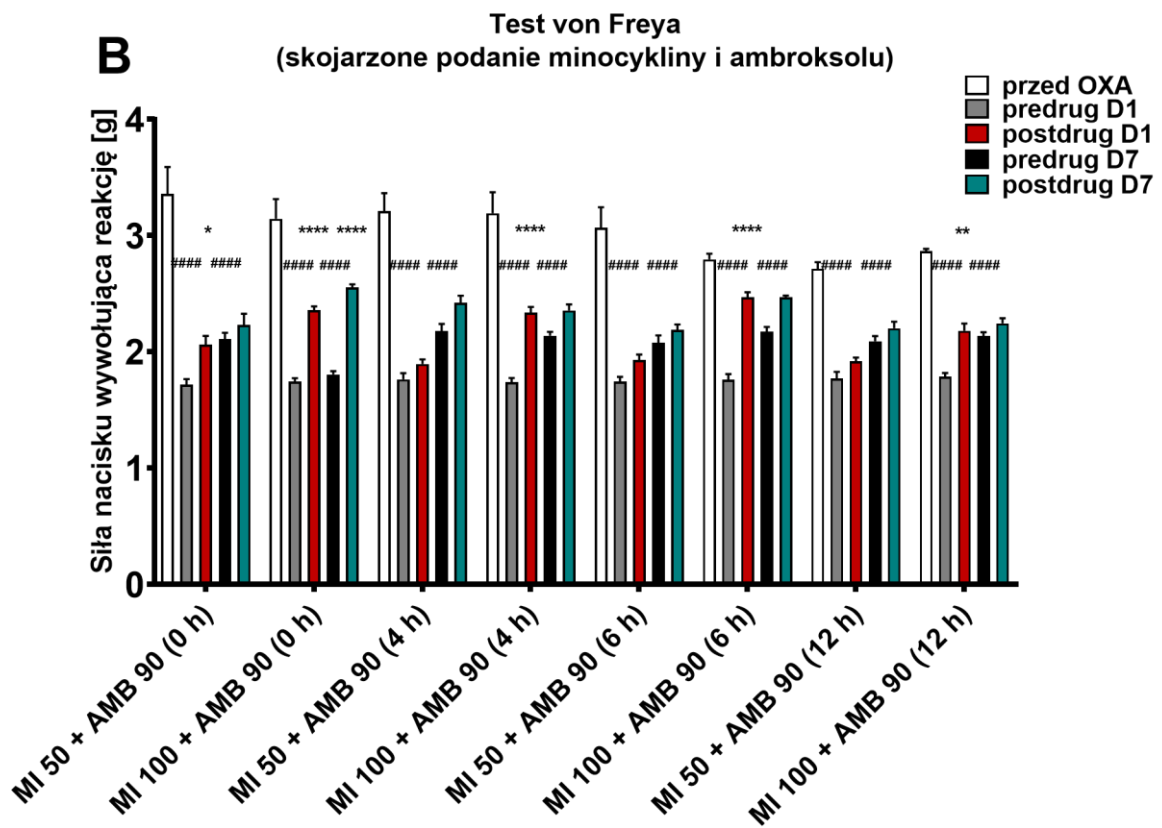
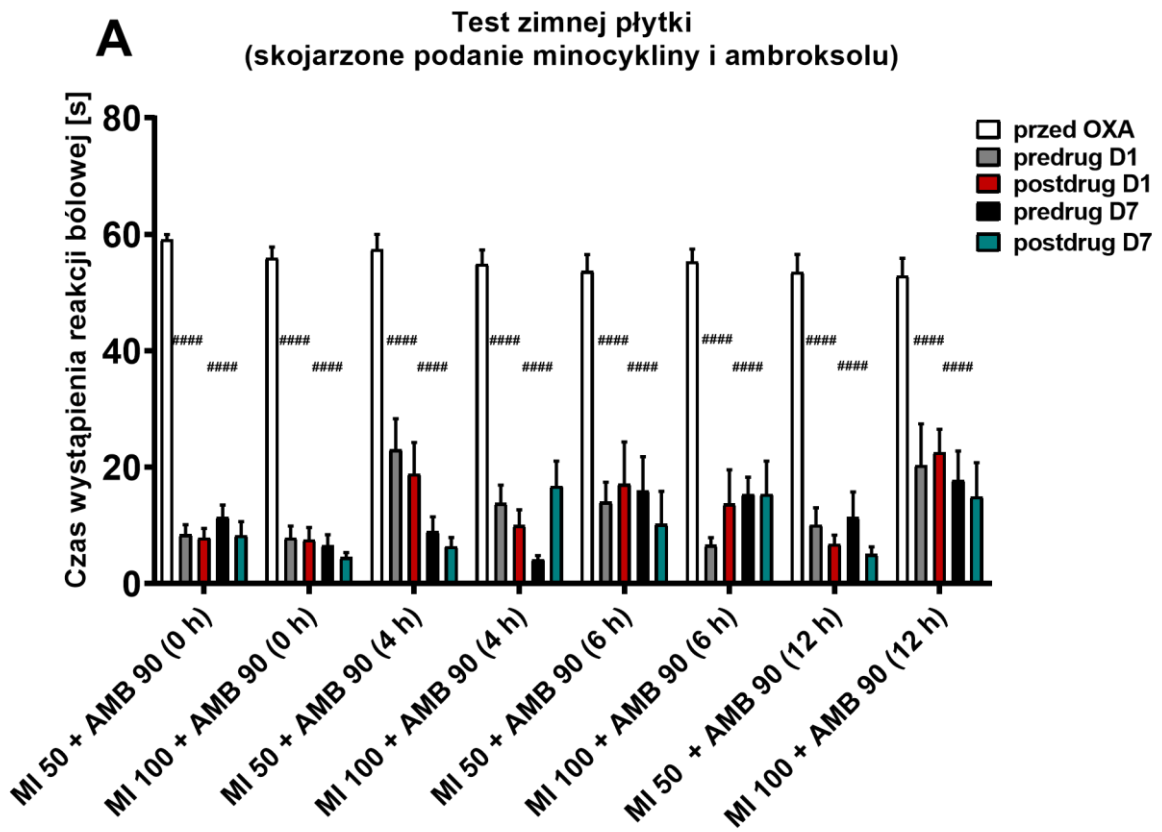
W teście zimnej płytki podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie obniżenie progu bólowego u myszy pierwszego i siódmego dnia eksperymentu ($P<0.0001$, Rycina 43A). Żadne z zastosowanych wariantów połączeń minocykliny i ambroksolu nie wykazało znamiennej aktywności przeciwbólowej, łagodzącej objawy nadwrażliwości termicznej w teście zimnej płytki.

W teście von Freya podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie obniżenie siły nacisku wywołującej reakcję bólową u myszy w odpowiedzi na działający bodziec mechaniczny pierwszego i siódmego dnia eksperymentu ($P<0.0001$, Rycina 43B). Najwyższą skuteczność analgetyczną wykazano w pierwszym dniu eksperymentu dla łącznego podania minocykliny w dawce 100 mg/kg i ambroksolu w dawce 90 mg/kg jednocześnie oraz po 4 h, 6 h ($P<0.0001$, Rycina 43B) i 12 h ($P<0.01$, Rycina 43B) od podania pierwszego leku, w tym przypadku minocykliny. Połączenie niższej dawki minocykliny (50 mg/kg) z ambroksolem, wykazało istotny wpływ na nadwrażliwość mechaniczną wyłącznie w schemacie podania jednoczesnego w pierwszym dniu eksperymentu ($P<0.05$, Rycina 43B).

W siódmym dniu eksperymentu skuteczność przeciwbólową wykazało wyłącznie połączenie minocykliny w dawce 100 mg/kg i ambroksolu w dawce 90 mg/kg podanych jednocześnie ($P<0.0001$, Rycina 43B).

Rycina 43. Wpływ minocykliny (50 i 100 mg/kg, i.p.) w połączeniu z ambroksolem (90 mg/kg, i.p.) podawanych w schemacie CDT na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla n=10 (± SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ##### P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły wywołującej reakcję bólową przed podaniem związków: minocykliny i ambroksolu w odpowiednim punkcie czasowym: * P<0.05, ** P<0.01, **** P<0.0001. OXA – oksaliplatyna, MI – minocyklina, AMB – ambroksol, predrug – pomiar przed podaniem związków, postdrug – pomiar po podaniu związków, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu, czas: 0 h – podanie jednoczesne związków (badanie aktywności analgetycznej wykonano po 1 h od podania leków), 4 h – badanie wykonano po 4 h od podania pierwszego leku, 6 h - badanie wykonano po 6 h od podania pierwszego leku, 12 h – badanie wykonano po 12 h od podania pierwszego leku.



4.3.8.2 Ocena skuteczności przeciwbólowej minocykliny w połączeniu z duloksetyną

Hamujące działanie na aktywację mikrogleju minocykliny zostało połączone z wpływem na wychwyty zwrotny 5-HT i NA, czyli działaniem prezentowanym przez duloksetynę. Działanie analgetyczne podania skojarzonego minocykliny z duloksetyną zostało ocenione w teście zimnej płytki oraz teście von Freya.

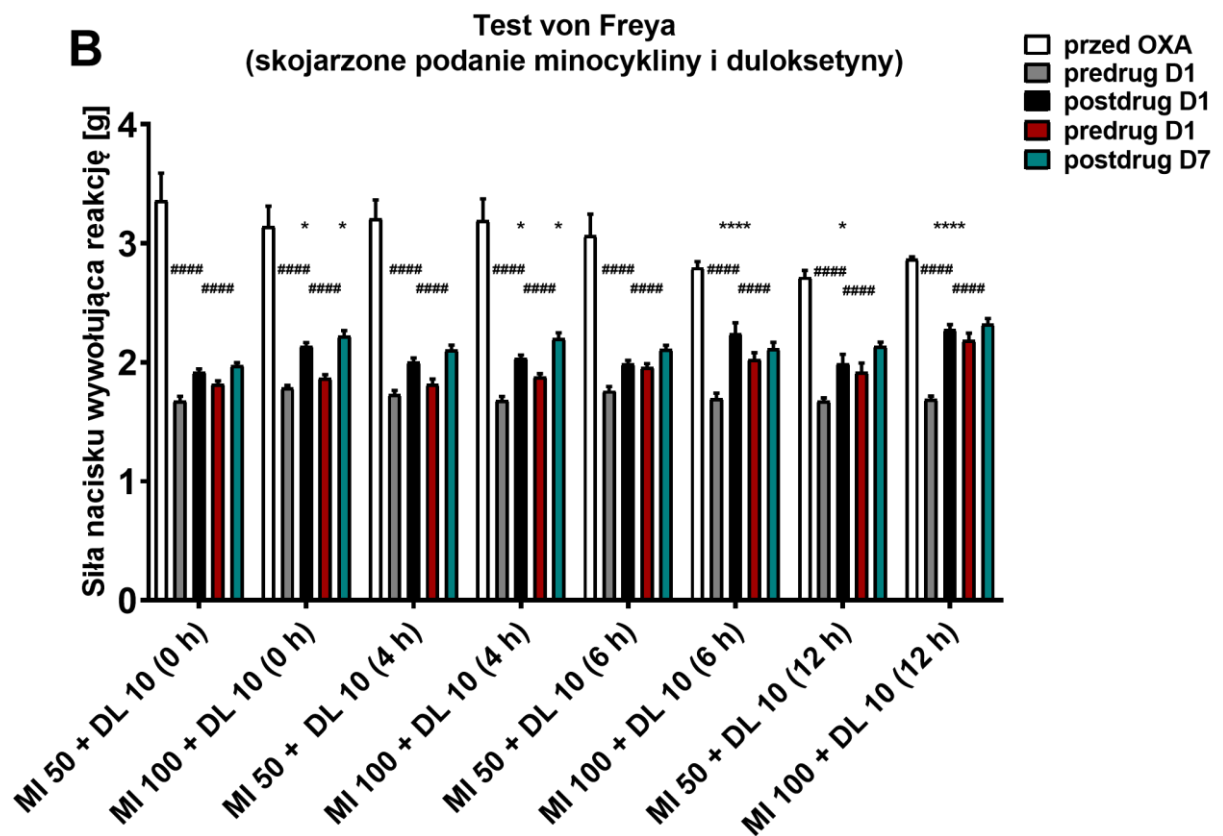
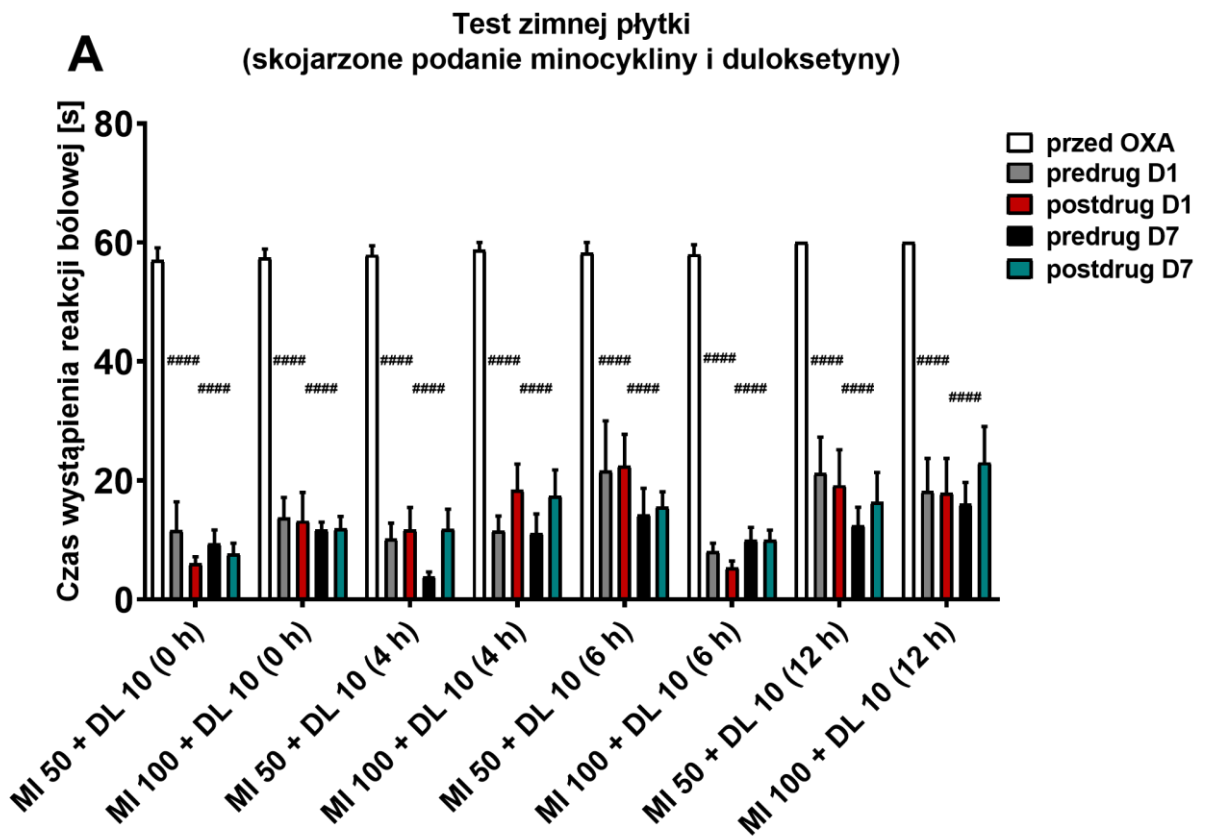
Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{7,360}=5.090$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{4,360}=241.1$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{28,360}=0.6708$, $P>0.05$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{7,360}=2.472$, $P<0.05$; *efekt „czasu”* $F_{4,360}=351.8$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{28,360}=3.457$, $P<0.0001$.

W teście zimnej płytki podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie obniżenie progu bólowego u myszy pierwszego i siódmego dnia eksperymentu w odpowiedzi na działający bodziec termiczny ($P<0.0001$, Rycina 44A). Żadne z zastosowanych wariantów połączeń minocykliny i duloksetyny nie wykazało znamiennej aktywności przeciwbólowej, łagodzącej objawy nadwrażliwości termicznej w teście zimnej płytki.

W teście von Freya podanie oksaliplatyny wywołało silne i istotne statystycznie obniżenie progu bólowego w odpowiedzi na działający bodziec mechaniczny we wszystkich grupach eksperymentalnych pierwszego i siódmego dnia pomiarów ($P<0.0001$, Rycina 44B). Znamienny efekt analgetyczny został zaobserwowany w przypadku połączenia minocykliny w dawce 100 mg/kg i duloksetyny w dawce 10 mg/kg w schemacie podania jednoczesnego i przebadanych po 4 h od podania minocykliny, zarówno pierwszego, jak i siódmego dnia eksperymentu ($P<0.05$, Rycina 44B). Połączenie tych dawek leków wykazało również silną aktywność pierwszego dnia pomiarów przebadanych po 6 h i 12 h od podania pierwszego leku ($P<0.0001$, Rycina 44B). Podanie podprogowych (tj. nieaktywnych w monoterapii) dawek minocykliny (50 mg/kg) i duloksetyny (10 mg/kg) wykazało aktywność przeciwbólową wyłącznie pierwszego dnia eksperymentu przebadanych po 12 h od podania pierwszego leku ($P<0.05$, Rycina 44B).

Rycina 44. Wpływ minocykliny (50 i 100 mg/kg, *i.p.*) w połączeniu z duloksetyną (10 mg/kg, *i.p.*) podawanych w schemacie CDT na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla n=10 (± SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ##### P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły wywołującej reakcję bólową przed podaniem związków w odpowiednim punkcie czasowym: * P<0.05, **** P<0.0001. OXA – oksaliplatyna, MI – minocyklina, DL – duloksetyna, predrug – pomiar przed podaniem związków, postdrug – pomiar po podaniu związków, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu, czas: 0 h – podanie jednoczesne związków (badanie wykonano po 1 h od podania leków), 4 h – badanie wykonano po 4 h od podania pierwszego leku, 6 h – badanie wykonano po 6 h od podania pierwszego leku, 12 h – badanie wykonano po 12 h od podania pierwszego leku.



4.3.8.3 Ocena skuteczności przeciwbólowej jednorazowego i wielokrotnego skojarzonego podania minocykliny z duloksetyną i ambroksolem

W kolejnym etapie badań oceniono aktywność analgetyczną łącznych podań (jednorazowych i wielokrotnych) minocykliny z ambroksolem i duloksetyną. W niniejszym eksperymencie leki podawano myszom w dawkach podprogowych, czyli minocyklinę w dawce 50 mg/kg, ambroksol w dawce 90 mg/kg i duloksetynę w dawce 10 mg/kg. Skuteczność połączeń lekowych oceniono w teście zimnej płytki i teście von Freya.

Podanie minocykliny i ambroksolu, test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{7,72}=34.29$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3,354,241.5}=187.5$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{28,288}=6.329$, $P<0.0001$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{7,72}=65.52$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3,652,262.9}=411.9$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{28,288}=23.69$, $P<0.0001$.

Podanie minocykliny i duloksetyny, test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{7,71}=30.39$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3,296,234}=180.9$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{28,284}=7.23$, $P<0.0001$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{7,72}=107.5$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{3,352,241.4}=442.4$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{28,288}=26.02$, $P<0.0001$.

W teście zimnej płytki podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie skrócenie czasu wystąpienia reakcji bólowej w pierwszym dniu eksperymentu ($P<0.001$, Rycina 45A). W siódmym dniu eksperymentu istotne statystycznie obniżenie progu bólowego zostało zaobserwowane dla niektórych grup eksperymentalnych ($P<0.01$, Rycina 45A) z wyjątkiem zwierząt otrzymujących wielokrotnie minocyklinę w dawce 50 mg/kg i duloksetynę w dawce 10 mg/kg. Podanie tego połączenia leków przez siedem dni po podaniu oksaliplatyny hamowało rozwój nadwrażliwości termicznej, znacząco wydłużając czas wystąpienia reakcji bólowej siódmego dnia pomiarów.

W teście von Freya podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie obniżenie siły nacisku wywołującej reakcję bólową myszy w pierwszym ($P<0.0001$, Rycina 45B) oraz siódmym dniu eksperymentu ($P<0.05$, Rycina 45B). Podanie minocykliny w dawce 50 mg/kg i duloksetyny w dawce 10 mg/kg wykazało istotny statystycznie efekt przeciwbólowy pierwszego dnia eksperymentu ($P<0.001$ – podanie wielokrotne; $P<0.01$ – podanie jednorazowe, Rycina 45B) oraz siódmego dnia eksperymentu ($P<0.05$, Rycina 45B). Dodatkowo pomiar przed podaniem leków wykonany siódmego dnia był znamienne wyższy w porównaniu do pomiaru wykonanego w pierwszym dniu po podaniu oksaliplatyny, zarówno w grupie otrzymującej leki jednorazowo ($P<0.05$, Rycina 45B), jak i wielokrotnie ($P<0.0001$, Rycina 45B). Co ważne, efekt ochronny polegający na hamowaniu rozwoju nadwrażliwości na bodźce mechaniczne mierzony po siedmiu dniach wielokrotnego podawania leków znacznie przewyższał ten obserwowany, gdy leki podawano jednorazowo.

Skojarzone podanie minocykliny w dawce 50 mg/kg oraz ambroksolu w dawce 90 mg/kg istotnie statystycznie podwyższało próg bólowy w pierwszym dniu eksperymentu ($P<0.05$, Rycina 45B). Zastosowanie zarówno podania jednorazowego ($P<0.01$, Rycina 45B), jak i wielokrotnego ($P<0.0001$, Rycina 45B) wywołało znamienne podwyższenie wartości pomiarów otrzymanych w siódmym dniu eksperymentu w porównaniu do pomiaru po podaniu oksaliplatyny z dnia pierwszego. Co ciekawe, znaczne działanie ochronne

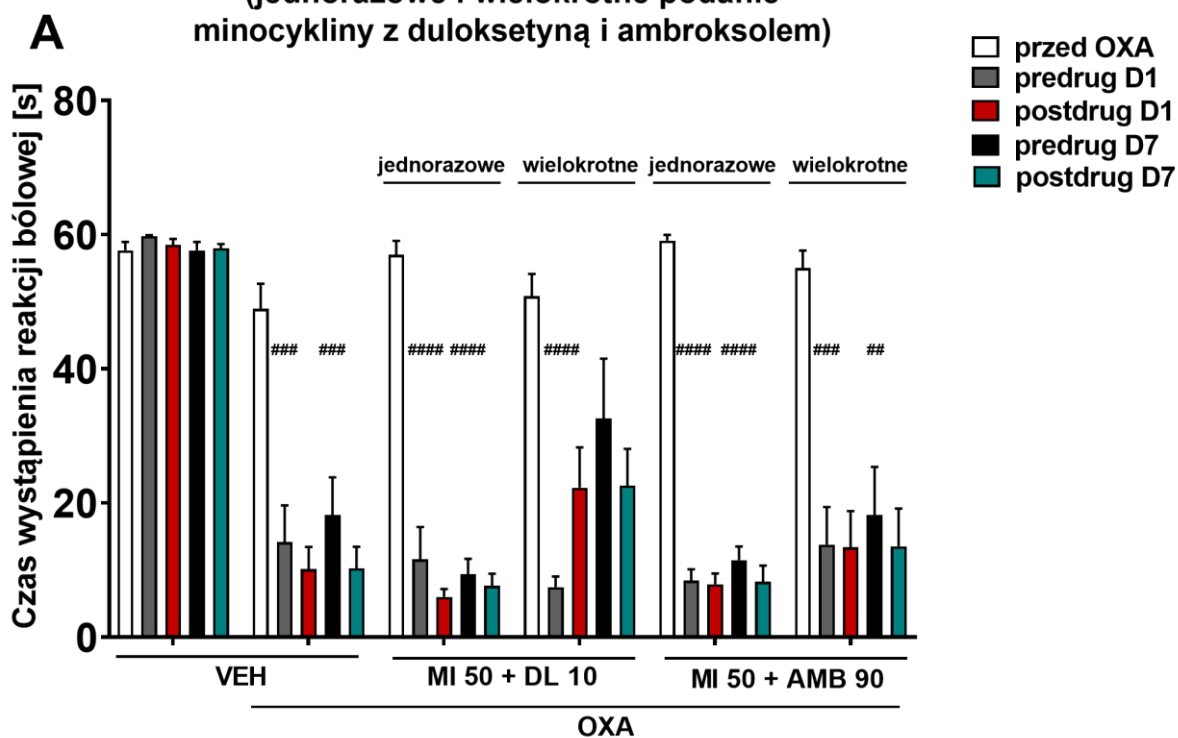
na rozwój nadwrażliwości mechanicznej po siedmiu dniach od podania cytostatyka wykazało już jednorazowe podanie leków w pierwszym dniu eksperymentu. Podanie minocykliny i ambroksolu w siódmym dniu eksperymentu, nie wykazało istotnego statystycznie działania przeciwbólowego.

Wyniki niniejszego eksperymentu opublikowano w pracy: Sałat, K., Furgała-Wojas, A., & Sałat, R. (2021). The microglial activation inhibitor minocycline used alone and in combination with duloxetine, attenuates pain caused by oxaliplatin in mice. *Molecules*, 26(12), 3577.

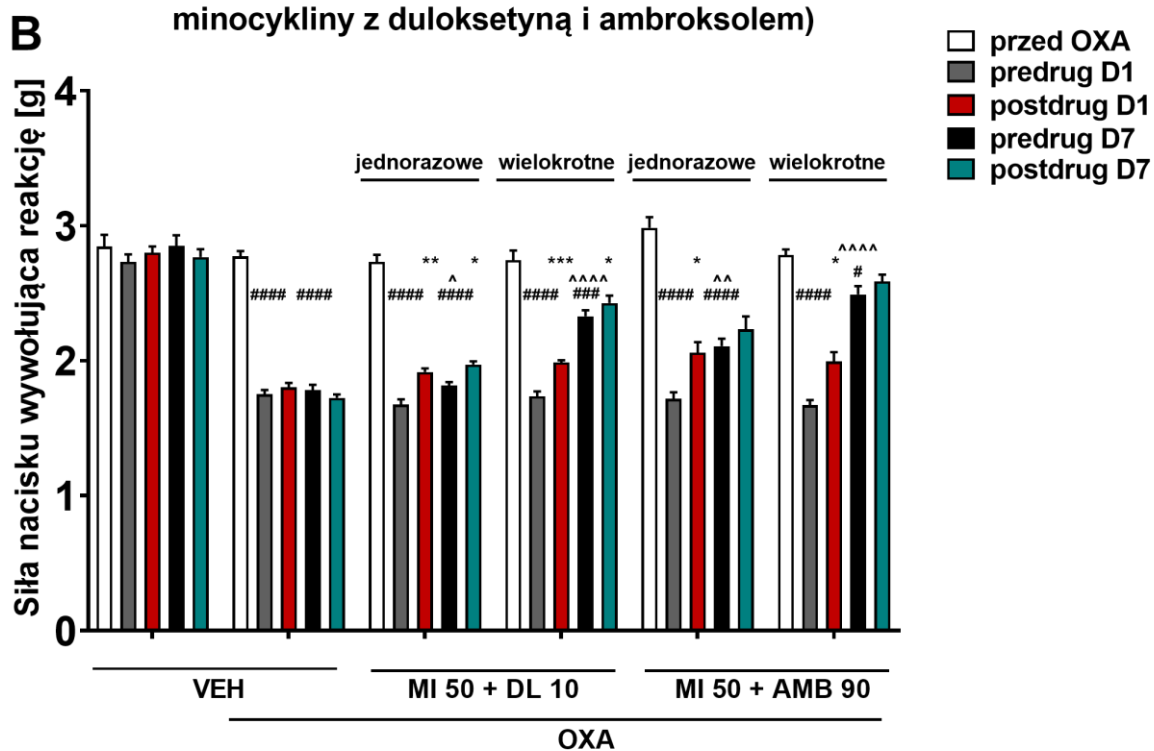
Rycina 45. Wpływ minocykliny (50 mg/kg, *i.p.*) w połączeniu z duloksetyną (10 mg/kg, *i.p.*) i ambroksolem (90 mg/kg, *i.p.*) podawanych jednorazowo i wielokrotnie na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki (A) i teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla $n=9-10$ (\pm SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły nacisku wywołującej reakcję przed podaniem związków w odpowiednim punkcie czasowym: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; znamienność statystyczna vs. pomiar zerowy pierwszego dnia eksperymentu: ^ $P<0.05$, ^^ $P<0.01$, ^^^ $P<0.0001$. OXA – oksaliplatyna, MI – minocyklina, DL – duloksetyna, AMB – ambroksol, predrug – pomiar przed podaniem związków, postdrug – pomiar po podaniu związków, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu. Grupa kontrolna, która otrzymała wyłącznie rozpuszczalnik (VEH) i nie otrzymała oksaliplatyny ma tożsame kolory słupków na wykresie jak pozostałe grupy, którym podano oksaliplatynę, ze względu na wykonywanie pomiarów w tych samych punktach czasowych.

Test zimnej płytki
(jednorazowe i wielokrotne podanie minocykliny z duloksetyną i ambroksolem)



Test von Freya
(jednorazowe i wielokrotne podanie połączenia minocykliny z duloksetyną i ambroksolem)



4.3.8.4 Ocena skuteczności przeciwbólowej minocykliny po 1 h, 4 h, 6 h i 12 h od podania

W celu sprawdzenia czy aktywność przeciwbólowa zastosowanych połączeń leków nie wynika z rozwijającego się w czasie działania minocykliny, oznaczono aktywność tego leku w punktach czasowych, w których prowadzono badania w schemacie podania skojarzonego (Rozdział 4.3.8.1 i 4.3.8.2). Pomiarów wykonano w teście zimnej płytki i teście von Freya.

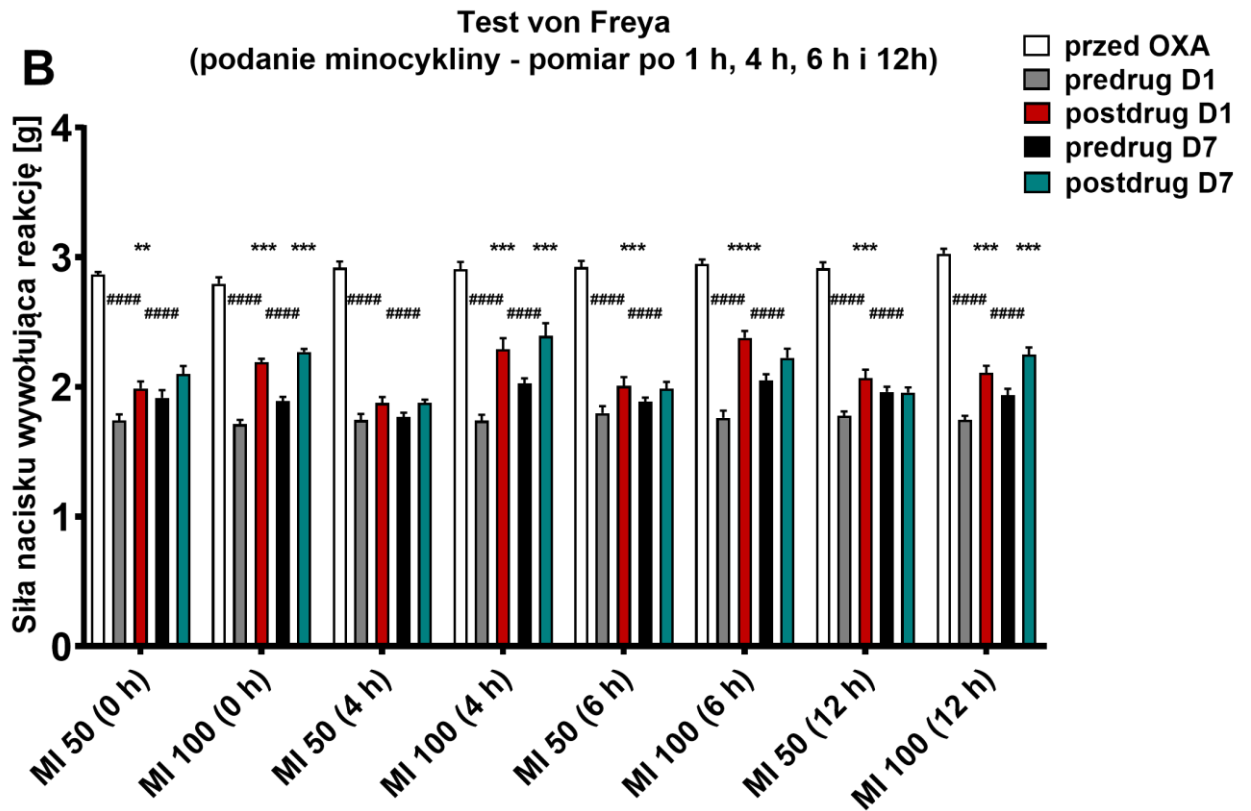
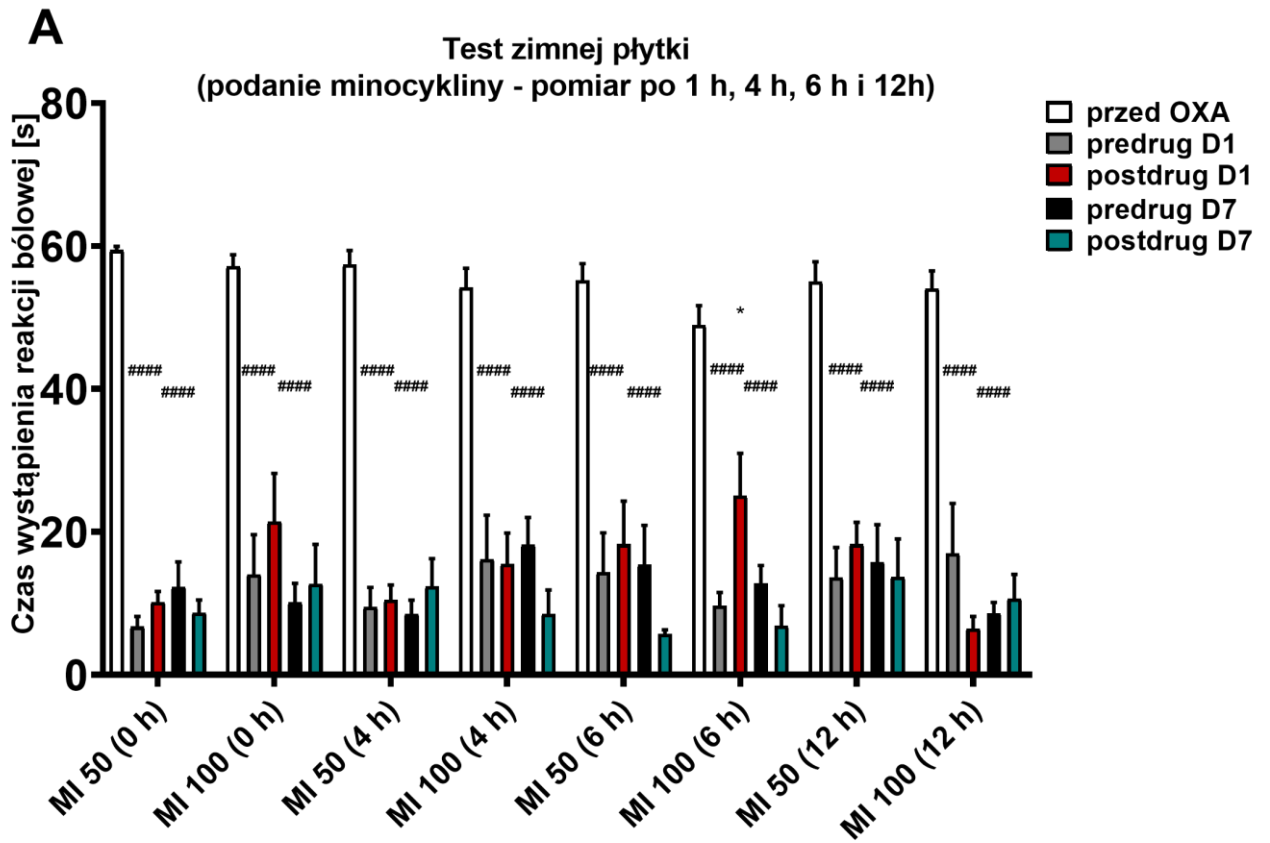
Test zimnej płytki: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{7,360}=0.912$, $P>0.05$; *efekt „czasu”* $F_{4,360}=195.9$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{28,360}=1.166$, $P>0.05$; test von Freya: *analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami: efekt „badanego związku”* $F_{7,360}=13.30$, $P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{4,360}=636.3$, $P<0.0001$; *efekt interakcji* $F_{28,360}=4.022$, $P<0.0001$.

W teście zimnej płytki podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie obniżenie progu bólowego we wszystkich grupach eksperymentalnych pierwszego i siódmego dnia pomiarów ($P<0.0001$, Rycina 46A). W teście zimnej płytki podanie minocykliny wykazało istotne statystycznie podwyższenie progu bólowego wyłącznie w grupie, która otrzymała minocyklinę w dawce 100 mg/kg, a pomiar wykonano po 6 h od podania leku ($P<0.05$, Rycina 46A).

W teście von Freya podanie oksaliplatyny wywołało istotne statystycznie obniżenie siły nacisku wywołującej reakcję zwierząt pierwszego i siódmego dnia eksperymentu ($P<0.0001$, Rycina 46B). Podanie minocykliny w dawce 50 mg/kg znamienne statystycznie podwyższało próg bólowy myszy mierzony pierwszego dnia eksperymentu po: 1 h ($P<0.01$, Rycina 46B), 6 h i 12 h ($P<0.001$, Rycina 46B) od podania leku. Z kolei, minocyklina w dawce 100 mg/kg wykazała istotny statystycznie efekt przeciwbólowy, łagodząc objawy nadwrażliwości mechanicznej u myszy mierzony pierwszego i siódmego dnia eksperymentu po 1 h, 4 h i 12 h od podania ($P<0.001$, Rycina 46B) oraz pierwszego dnia eksperymentu po 6 h od podania ($P<0.0001$, Rycina 46B).

Rycina 46. Wpływ minocykliny (50 i 100 mg/kg, i.p.) po 1 h, 4 h, 6 h i 12 h od podania na próg bólowy u myszy mierzony w teście zimnej płytki (A) oraz teście von Freya (B).

Nadwrażliwość termiczną i mechaniczną oceniano w dniu podania oksaliplatyny (D1) oraz 7 dni po jej podaniu (D7). Wyniki przedstawiono jako średni czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na stymulację termiczną (test zimnej płytki, temperatura 2.5 °C) oraz średnią siłę nacisku wywołującą reakcję bólową w odpowiedzi na stymulację mechaniczną (test von Freya) dla n=10 (± SEM). Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Znamienność statystyczna vs. pomiar przed podaniem oksaliplatyny: ##### P<0.0001; znamienność statystyczna vs. pomiar czasu reakcji bólowej/siły wywołującej reakcję bólową przed podaniem związków w odpowiednim punkcie czasowym: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001. OXA – oksaliplatyna, MI – minocyklina, predrug – pomiar przed podaniem minocykliny, postdrug – pomiar po podaniu minocykliny, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu, czas: 0 h – badanie wykonano po 1 h od podania minocykliny, 4 h – badanie wykonano po 4 h od podania minocykliny, 6 h – badanie wykonano po 6 h od podania minocykliny, 12 h – badanie wykonano po 12 h od podania minocykliny.



4.4 ANALIZA WYBRANYCH POMIARÓW AKTYWNOŚCI LOKOMOTORYCZNEJ I WPŁYWU NA KOORDYNACJĘ RUCHOWĄ ZWIERZĄT

W ramach kolejnego etapu badań oceniono czy związki i ich połączenia mogą wpływać na aktywność lokomotoryczną i koordynację ruchową zwierząt. Wykazanie takiej aktywności lub jej braku pozwoliło ocenić, czy efekty obserwowane w testach oznaczających aktywność przeciwbólową są związane z rzeczywistym działaniem przeciwbólowym, czy są wynikiem fałszywie pozytywnym.

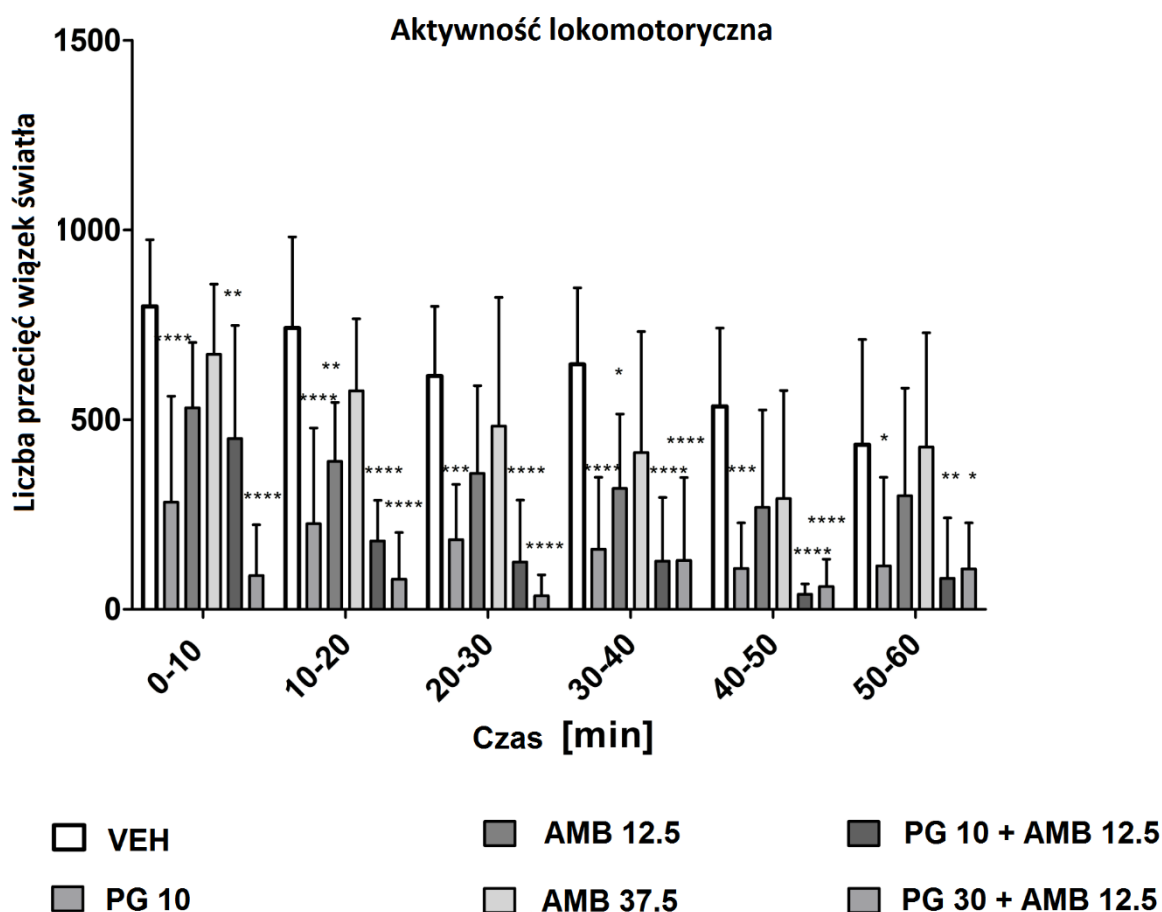
W niniejszym rozdziale przedstawione zostały wyłącznie wybrane wyniki wykazujące istotny statystycznie negatywny wpływ badanych związków na koordynację ruchową i aktywność lokomotoryczną zwierząt, co mogło potencjalnie rzutować na wyniki aktywności analgetycznej.

Schematy wykonanych pomiarów różniły się od siebie, co było związane z dostosowaniem poszczególnych testów do doświadczeń opisanych jako testy aktywności przeciwbólowej. Zwierzęta, którym wykonywano pomiary wpływu na koordynację ruchową oraz aktywność lokomotoryczną, otrzymały każdorazowo oksaliplatynę oraz badane związki w sposób analogiczny jak w testach oceniających aktywność przeciwbólową.

4.4.1 Wpływ pregabaliny i ambroksolu podawanych oddzielnie i w skojarzeniu na aktywność lokomotoryczną

Test aktywności lokomotorycznej: analiza wariancji z powtarzaniem pomiarów: efekt „badanych związków” $F_{5,38}=11.78$; $P<0.0001$; efekt „czasu” $F_{5,190}=18.72$, $P<0.0001$; efekt interakcji $F_{25,190}=1.602$, $P<0.05$.

Podanie pregabaliny w dawce 10 mg/kg hamowało aktywność lokomotoryczną u myszy we wszystkich przedziałach czasowych. Ambroksol w dawce 12.5 mg/kg obniżał aktywność lokomotoryczną zwierząt w przedziałach czasowych: 10-20 min ($P<0.01$, Rycina 47) i 30-40 min ($P<0.05$, Rycina 47). Oba zastosowane połączenia pregabaliny i ambroksolu znacząco zmniejszały aktywność lokomotoryczną we wszystkich przedziałach czasowych (Rycina 47). Dawki pregabaliny i ambroksolu wybrane do poniższego testu wyselekcjonowano w oparciu o wyniki otrzymane w teście oceniającym aktywność analgetyczną tych leków (Rozdział 4.3.2).



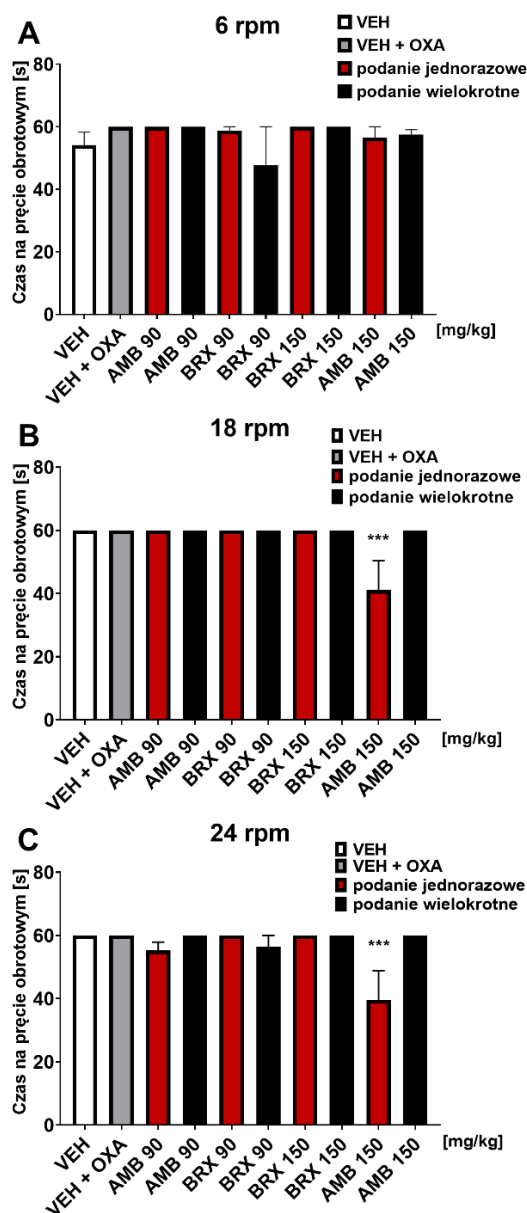
Rycina 47. Wpływ pregabaliny (10 i 30 mg/kg, *i.p.*), ambroksolu (12.5 i 37.5 mg/kg, *i.v.*) oraz połączenia pregabaliny i ambroksolu na aktywność lokomotoryczną u myszy.

Wyniki przedstawiono jako średnią liczbę przecięć wiązek światła (\pm SEM) w czasie 60 minut dla $n=7-8$. Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzaniem pomiarów i test *post hoc* Bonferroniego. Istotność statystyczna vs. grupa kontrolna: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. AMB – ambroksol, PG – pregabalina.

4.4.2 Wpływ ambroksolu i bromheksyny podanych jednorazowo i wielokrotnie na koordynację ruchową

Test pręta obrotowego: *jednoczynnikowa analiza wariancji: efekt „badanego związku” przy prędkości: 6 rpm $F_{9,50}=0.7827$, $P>0.05$; 18 rpm $F_{9,50}=2.849$, $P<0.01$; 24 rpm $F_{9,50}=2.903$, $P<0.01$).*

Podanie oksaliplatin nie wywołało negatywnego wpływu na koordynację ruchową zwierząt. Istotnie statystycznie zaburzenie koordynacji ruchowej wywoływał ambroksol podany w dawce 150 mg/kg w teście pręta obrotowego przy prędkości 18 i 24 obr./min ($P<0.001$, Rycina 48).



Rycina 48. Wpływ ambroksolu i bromheksyny (90 i 150 mg/kg, *i.p.*) na koordynację ruchową u myszy.

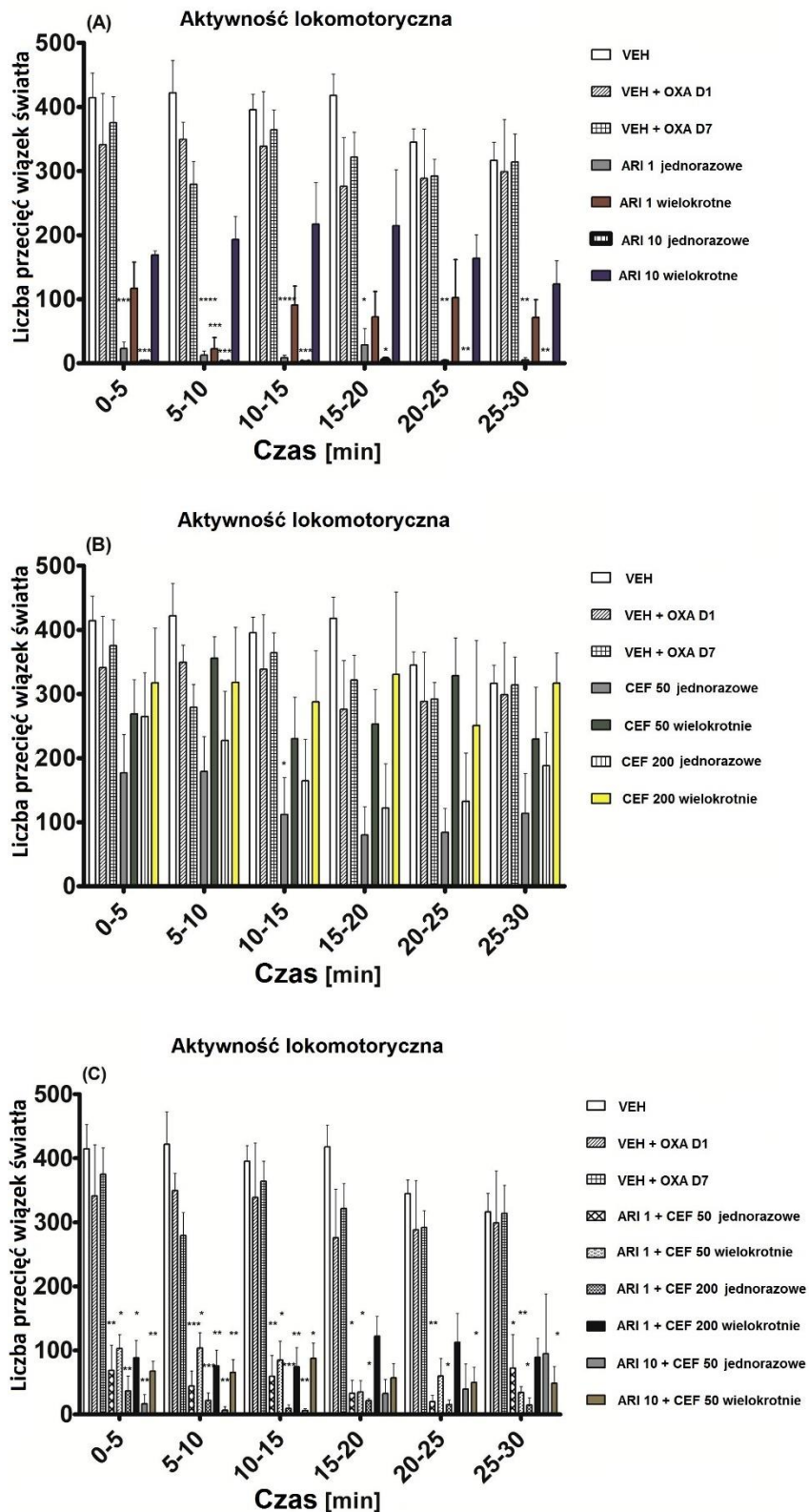
Wyniki przedstawiono jako średni czas spędzony na przecie obrotowym (\pm SEM) obracającym się z prędkością 6 obr./min, 18 obr./min i 24 obr./min dla $n=6-8$. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa analiza wariancji i test *post hoc* Dunnetta. Istotność w porównaniu z grupa kontrolną, która nie otrzymała oksaliplatin: *** $P<0.001$. OXA – oksaliplatin, AMB – ambroksol, BRX – bromheksyna.

4.4.3 Wpływ aripiprazolu i ceftriaksonu podawanych oddzielnie i w skojarzeniu na aktywność lokomotoryczną

Test aktywności lokomotorycznej: *analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami: efekt „badanych związków”* $F_{16,72}=13.55, P<0.0001$; *efekt „czasu”* $F_{5,360}=2.71, P<0.05$; *efekt interakcji* $F_{80,360}=1.03, P>0.05$.

Podanie oksaliplatyny nie wywołało negatywnego wpływu na aktywność lokomotoryczną myszy. Istotnie statystycznie obniżenie aktywności lokomotorycznej u myszy odnotowano u zwierząt otrzymujących aripiprazol w dawkach 1 mg/kg i 10 mg/kg (podanie jednorazowe) we wszystkich punktach czasowych w porównaniu do grupy kontrolnej otrzymującej oksaliplatynę w dniu jej podania (Rycina 49A). Wielokrotne podanie aripiprazolu w dawkach 1 mg/kg i 10 mg/kg wywoływało również zahamowanie aktywności lokomotorycznej, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie (Rycina 49A).

Ceftriakson podawany jednorazowo i wielokrotnie nie powodował zaburzeń w aktywności lokomotorycznej zwierząt (Rycina 49B). Natomiast wszystkie połączenia aripiprazolu i ceftriaksonu, podawane zarówno jednorazowo oraz wielokrotnie, silnie hamowały aktywność lokomotoryczną zwierząt praktycznie w każdym przedziale czasowym (Rycina 49C).



Rycina 49. Wpływ aripiprazolu (1 i 10 mg/kg, *i.p.*) i ceftriaksonu (50 i 200 mg/kg, *i.p.*) na aktywność lokomotoryczną u myszy.

Wyniki przedstawiono jako średnią liczbę przecięć wiążek światła (\pm SEM) w czasie 30 min dla $n=6-8$. Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami i test *post hoc* Bonferroni. Istotność statystyczna vs. pomiar grupy kontrolnej, która otrzymała oksaliplatynę w pierwszym dniu eksperymentu: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. OXA – oksaliplatyna, ARI – aripiprazol, CEF – ceftriakson, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu.

4.4.4 Wpływ aripiprazolu i ceftriaksonu podawanych oddzielnie i w skojarzeniu na koordynację ruchową

Test pręta obrotowego: *jednoczynnikowa analiza wariancji: efekt „badanego związku” przy prędkości: 6 rpm: $F_{15,80}=1.276$, $P>0.05$; 18 rpm: $F_{15,80}=3.721$, $P<0.0001$; 24 rpm: $F_{15,80}=7.054$, $P<0.0001$.*

Podanie oksaliplatyny nie wywołało negatywnego wpływu na koordynację ruchową zwierząt. W teście pręta obrotowego wykazano istotne statystycznie zaburzenia koordynacji ruchowej w grupach myszy otrzymujących: jednorazowo aripiprazol w dawce 1 mg/kg ($P<0.01$, 24 rpm), jednorazowo aripiprazol w dawce 10 mg/kg ($P<0.001$, 18 i 24 rpm) oraz podanie skojarzone aripiprazolu w dawce 1 mg/kg z ceftriaksonem w dawce 50 mg/kg ($P<0.05$, 24 rpm) i 200 mg/kg ($P<0.01$, 24 rpm; Tabela 2).

Tabela 2. Wpływ aripiprazolu (1 i 10 mg/kg, i.p.) i ceftriaksonu (50 i 200 mg/kg, i.p.) podawanych oddzielnie i w skojarzeniu na koordynację ruchową zwierząt mierzoną w teście pręta obrotowego.

Związek [mg/kg]	Czas utrzymania się na pręcie [s] ± SEM (6 rpm)	Czas utrzymania się na pręcie [s] ± SEM (18 rpm)	Czas utrzymania się na pręcie [s] ± SEM (24 rpm)
VEH	54.2 ± 4.1	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
VEH + OXA	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
ARI 1 jednorazowe	60.0 ± 0.0	51.0 ± 3.5	19.3 ± 6.8 **
ARI 1 wielokrotne	51.4 ± 7.3	54.1 ± 5.9	47.8 ± 8.1
ARI 10 jednorazowe	44.8 ± 5.3	11.3 ± 7.6 ***	13.5 ± 7.1 ***
ARI 10 wielokrotne	60.0 ± 0.0	54.5 ± 5.0	60.0 ± 0.0
CEF 50 jednorazowe	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
CEF 50 wielokrotne	57.5 ± 2.5	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
CEF 200 jednorazowe	57.8 ± 2.3	60.0 ± 0.0	56.3 ± 3.8
CEF 200 wielokrotne	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
ARI 1 + CEF 50 jednorazowe	59.3 ± 0.8	40.5 ± 8.2	28.3 ± 11.0 *
ARI 1 + CEF 50 wielokrotne	60.0 ± 0.0	42.5 ± 13.5	47.0 ± 11.4
ARI 1 + CEF 200 jednorazowe	60.0 ± 0.0	41.0 ± 12.6	22.8 ± 13.2 **
ARI 1 + CEF 200 wielokrotne	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	47.8 ± 7.1
ARI 10 + CEF 50 jednorazowe	60.0 ± 0.0	42.5 ± 13.5	34.3 ± 9.0
ARI 10 + CEF 50 wielokrotne	59.7 ± 0.3	46.5 ± 7.1	36.1 ± 7.0

Wyniki przedstawiono jako średni czas utrzymywania się zwierząt na obracającym się pręcie (± SEM) przy prędkości 6 rpm, 18 rpm i 24 rpm dla n = 6–8. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa analiza wariancji i test *post hoc* Dunnetta. Istotność w porównaniu z grupą kontrolną, która otrzymała oksaliplatynę w pierwszym dniu eksperymentu: * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$. OXA – oksaliplatyna, ARI – aripiprazol, CEF – ceftriakson.

4.4.5 Wpływ minocykliny, duloksetyny i skojarzonego podania minocykliny z ambroksolem i duloksetyną na koordynację ruchową zwierząt

Test pręta obrotowego: *jednoczynnikowa analiza wariancji: efekt „badanego związku” przy prędkości: 6 rpm: $F_{19,136}=2.014$, $P<0.05$; 18 rpm: $F_{19,136}=7.368$, $P<0.0001$; 24 rpm: $F_{19,136}=8.480$, $P<0.0001$.*

Podanie oksaliplaty nie wpływało negatywnie na koordynację ruchową zwierząt. W modelu zwierzęcym CIPN indukowanym podaniem oksaliplaty, zastosowanie minocykliny w dawkach 50 i 100 mg/kg nie wpływało negatywnie na koordynację ruchową zwierząt w teście pręta obrotowego, zarówno w schemacie podania jednorazowego, jak i wielokrotnego (Tabela 3).

Z kolei podanie duloksetyny w dawce 10 mg/kg w schemacie podania jednorazowego wykazało niekorzystny wpływ na koordynację ruchową zwierząt ocenianą w siódmym dniu eksperymentu ($P<0.0001$, 18 i 24 rpm; Tabela 3). Również duloksetyna podana w dawce 30 mg/kg istotnie statystycznie zaburzała koordynację ruchową badaną w pierwszym i siódmym dniu pomiarów, a efekt ten zaobserwowano dla jednorazowego i wielokrotnego podania tego leku ($P<0.01$, Tabela 3).

Zastosowanie podania skojarzonego minocykliny w dawce 50 mg/kg z ambroksolem w dawce 90 mg/kg oraz z duloksetyną w dawce 10 mg/kg nie zaburzało koordynacji ruchowej zwierząt badanej w teście pręta obrotowego (Tabela 3).

Tabela 3. Wpływ minocykliny (50 i 100 mg/kg, *i.p.*), duloksetyny (10 i 30 mg/kg, *i.p.*) i skojarzonego podania minocykliny z ambroksolem (90 mg/kg, *i.p.*) i duloksetyną na koordynację ruchową myszy w teście pręta obrotowego.

Związek [mg/kg]	Czas utrzymania się na pręcie [s] ± SEM (6 rpm)	Czas utrzymania się na pręcie [s] ± SEM (18 rpm)	Czas utrzymania się na pręcie [s] ± SEM (24 rpm)
VEH	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	47.0 ± 8.5
VEH + OXA	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
MI 50 jednorazowo D1	54.8 ± 5.3	60.0 ± 0.0	53.0 ± 7.0
MI 50 jednorazowo D7	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
MI 50 wielokrotnie D7	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
MI 100 jednorazowo D1	46.8 ± 8.7	48.3 ± 7.7	36.5 ± 9.1
MI 100 jednorazowo D7	46.0 ± 5.6	43.8 ± 10.2	42.7 ± 9.6
MI 100 wielokrotnie D7	51.6 ± 5.5	60.0 ± 0.0	55.8 ± 2.8
MI 50 + AMB 90 jednorazowo D1	57.5 ± 2.5	60.0 ± 0.0	58.3 ± 1.8
MI 50 + AMB 90 jednorazowo D7	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
MI 50 + AMB 90 wielokrotnie D7	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
DL 10 jednorazowo D1	60.0 ± 0.0	49.6 ± 5.2	54.3 ± 3.8
DL 10 jednorazowo D7	52.9 ± 4.7	16.8 ± 3.5 ****	9.6 ± 1.7 ****
DL 10 wielokrotnie D7	60.0 ± 0.0	56.5 ± 2.3	56.0 ± 2.6
DL 30 jednorazowo D1	49.3 ± 7.0	36.0 ± 6.8 **	23.5 ± 8.3 ***
DL 30 jednorazowo D7	44.7 ± 6.0	49.5 ± 5.6	16.0 ± 2.8 ****
DL 30 wielokrotnie D7	54.8 ± 3.4	60.0 ± 0.0	28.8 ± 8.2 **
MI 50 + DL 10 jednorazowo D1	60.0 ± 0.0	49.8 ± 6.7	57.4 ± 1.7
MI 50 + DL 10 jednorazowo D7	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	48.9 ± 7.3
MI 50 + DL 10 wielokrotnie D7	60.0 ± 0.0	49.4 ± 7.0	47.8 ± 7.2

Wyniki przedstawiono jako średni czas utrzymania się na obracającym się pręcie (± SEM) przy prędkości 6 rpm, 18 rpm i 24 rpm dla n = 6–8. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa analiza wariancji i test *post hoc* Tukeya. Istotność w porównaniu z grupą kontrolną, która otrzymała oksaliplatinę: ** P<0.01; *** P<0.001, **** P<0.0001. OXA – oksaliplatina, MI – minocyklina, DL – duloksetyna, AMB – ambroksol, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu. Wyniki wpływu na koordynację ruchową zwierząt dla ambroksolu podanego jednorazowo i wielokrotnie przedstawiono we wcześniejszym badaniu (Rozdział 4.4.2).

4.4.6 Wpływ lakoamidu i jego skojarzonego podania z ambroksolem i pregabaliną na koordynację ruchową zwierząt

Test pręta obrotowego: *jednoczynnikowa analiza wariancji: efekt „badanego związku” przy prędkości: 6 rpm $F_{13,42}=5.226$, $P<0.0001$; 18 rpm $F_{13,42}=4.033$, $P<0.001$; 24 rpm $F_{13,42}=3.863$, $P<0.001$.*

Podanie oksaliplatyny nie wpływało negatywnie na koordynację ruchową zwierząt. W modelu zwierzęcym CIPN indukowanym podaniem oksaliplatyny, zastosowanie lakoamidu w dawkach 10 i 30 mg/kg nie zaburzało koordynacji ruchowej myszy mierzonej w teście pręta obrotowego (Tabela 4).

Lakoamid w dawce 30 mg/kg podany łącznie z ambroksolem w dawce 90 mg/kg istotnie statystycznie zaburzał koordynację ruchową myszy zarówno w pierwszym, jak i siódmym dniu eksperymentu. Efekt ten był obserwowany przy wszystkich prędkościach obrotów pręta ($P<0.05$, Tabela 4).

Tabela 4. Wpływ lakoamidu (10 i 30 mg/kg, *i.p.*) i jego skojarzonego podania z ambroksolem (90 mg/kg, *i.p.*) i pregabaliną (10 i 30 mg/kg, *i.p.*) na koordynację ruchową myszy w teście pręta obrotowego.

Związek [mg/kg]	Czas utrzymywania się na pręcie [s] ± SEM (6 rpm)	Czas utrzymywania się na pręcie [s] ± SEM (18 rpm)	Czas utrzymywania się na pręcie [s] ± SEM (24 rpm)
VEH	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
VEH + OXA	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
LAK 10 D1	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
LAK 30 D1	47.8 ± 4.1	47.5 ± 12.5	46.8 ± 13.3
LAK 10 D7	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	57.5 ± 2.5
LAK 30 D7	60.0 ± 0.0	36.5 ± 13.87	35.0 ± 11.84
LAK 10 + AMB 90 D1	60.0 ± 0.0	59.3 ± 0.75	38.0 ± 12.8
LAK 10 + AMB 90 D7	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
LAK 30 + AMB 90 D1	34.5 ± 14.8 *	18.0 ± 6.3 **	13.3 ± 3.1 **
LAK 30 + AMB 90 D7	18.0 ± 14.2 ***	23.0 ± 12.71 **	18.0 ± 14.0 **
PG 10 + LAK 10 D1	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
PG 10 + LAK 10 D7	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0	60.0 ± 0.0
PG 30 + LAK 10 D1	60.0 ± 0.0	56.8 ± 3.3	42.3 ± 10.3
PG 30 + LAK 10 D7	60.0 ± 0.0	46.5 ± 13.5	40.3 ± 12.2

Wyniki przedstawiono jako średni czas utrzymania się na obracającym się pręcie (± SEM) przy prędkości 6 rpm, 18 rpm i 24 rpm. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa analiza wariancji i test *post hoc* Dunnetta. Istotność w porównaniu z grupą kontrolną, która otrzymała oksaliplatynę: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; *** $P<0.001$. OXA – oksaliplatyna, LAK – lakoamid, AMB – ambroksol, PG – pregabalina, D1 – pierwszy dzień eksperymentu, D7 – siódmy dzień eksperymentu.

4.5 WPŁYW PREGABALINY I DULOKSETYNY NA PRÓG BÓLOWY U MYSZY INDUKOWANY BODŹCEM TERMICZNYM – TEST PREFERENCJI MIEJSCA

W ostatnim etapie badań użyto nowej aparatury skonstruowanej w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki (numer projektu: UMO2015/17/B/NZ7/02937). Dwupłytkowy analgezometr (Rycina 50) umożliwia swobodne poruszanie się zwierząt pomiędzy płytkami, których temperatura jest ustawiona w dowolnie regulowany sposób w zakresie 0–55 °C. Konstrukcja nowego aparatu do pomiarów preferencji temperaturowych zwierząt stanowi nowatorskie rozwiązanie w zakresie badań bólu ze względu na: pomiar wyłącznie bólu indukowanego termicznie, możliwość kontrolowania i dowolnego ustawienia temperatury na dwóch płytkach, szybkie i precyzyjne ustawienie temperatury poszczególnych płytek, możliwość ustawienia stref termicznych różniących się temperaturą w wąskim zakresie. Zwierzęta w trakcie pomiarów nie są unieruchomione i same wybierają bardziej komfortowe dla nich strefy termiczne. Pomiar charakteryzuje wysoka obiektywność ze względu na rejestrację eksperymentu przy użyciu kamery oraz analizę nagrań z wykorzystaniem metod matematyczno – komputerowych.

W ramach tej części badań zbadano wpływ dwóch leków: pregabaliny i duloksetyny na preferencję termiczną myszy z wykorzystaniem skonstruowanej aparatury badawczej.



Rycina 50. Prototyp analgezymetru wykorzystanego w eksperymencie do oceny preferencji termicznych zwierząt.

W zaprezentowanej metodzie miarą działania analgetycznego pregabaliny i duloksetyny była utrata preferencji lub odwrócenie preferencji temperaturowych u zwierząt otrzymujących oksaliplatinę, w porównaniu do preferencji obserwowanych przed podaniem badanych leków.

W przypadku pomiaru wykonywanego przed podaniem oksaliplatiny, w grupach, które w późniejszym etapie eksperymentu otrzymywały duloksetynę, zwierzęta umieszczane w analgezymetrze, wybierały płytkę o wyższej temperaturze w zakresie temperatur 0–35 °C ($P < 0.05$, Rycina 51A–G). Najsilniej ten efekt zaobserwowano w grupie zwierząt umieszczonych na płytkach w przedziale temperatur 0–15 °C. Co ciekawe, podanie wyłącznie oksaliplatiny nie wywołało istotnej zmiany preferencji temperaturowych zwierząt. Preferencje zwierząt, które nie otrzymały oksaliplatiny w kierunku wyboru płytki o temperaturze niższej zaobserwowano jedynie w przypadku ostatniej grupy, którą testowano w zakresie temperatur płytek: 40–45 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51I). Dodatkowo brak znamienych różnic w preferencji temperaturowej zaobserwowano w przypadku grupy badanej na płytkach o temperaturze 35 i 40 °C (Rycina 51H) w przypadku pomiaru przed podaniem oksaliplatiny (myszy bez neuropatii). Bardzo podobne efekty, dla zwierząt odnotowano przed podaniem pregabaliny. Preferencje w kierunku wyboru temperatury wyższej zaobserwowano w zakresie temperatur 0–30 °C ($P < 0.05$, Rycina 51A–F), przy czym szczególnie ten efekt był widoczny w grupie testowanej w temperaturach: 0 i 5 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51A).

Podanie duloksetyny w sposób istotny statystycznie zmieniało % czasu spędzanego na płytkach o niższej temperaturze w przypadku grup zwierząt, u których pomiar wykonywano w temperaturach: 5 i 10 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51B) oraz 35 i 40 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51H) i 40 i 45 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51I). W tej ostatniej grupie obserwowany efekt był najsilniejszy. Wskazuje to, że w zakresie temperatur 5 i 10 °C duloksetyna podnosiła próg bólowy zwierząt w modelu CIPN indukowanej oksaliplatiną. Z kolei w zakresach 35 i 40 °C oraz 40 i 45 °C zwierzęta unikały stresu cieplnego i wybierały niższe temperatury płytki.

Co więcej, podanie duloksetyny w grupach badanych na płytkach o temperaturze: 0 i 5 °C, 20 i 25 °C, 25 i 30 °C oraz 30 i 35 °C skutkowało zanikiem preferencji temperaturowych u zwierząt. Jak wskazuje literatura, temperatury w zakresie 20–35 °C to temperatury optymalne dla gryzoni, czym można tłumaczyć zaobserwowany brak preferencji do jednej z płytek. Natomiast zanik preferencji w stosunku do płytki ustawionej na 5 °C może wskazywać na to, że w zakresie 0–5 °C duloksetyna wykazuje aktywność przeciwbólową. Należy w tym miejscu podkreślić, że badania aktywności przeciwbólowej w modelu oksaliplatinowym są wykonywane właśnie w zakresie temperatur do 5 °C (myszy i szczury) - tak ustawiony zakres temperatur pozwala rzetelnie oznaczyć aktywność związków referencyjnych, do których właśnie należy duloksetyna. Z kolei, statystycznie istotne preferowanie przez zwierzęta płytki o temperaturze wyższej zaobserwowano podczas doświadczenia, w którym użyto płytek o temperaturze 10 i 15 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51C) oraz 15 i 20 °C ($P < 0.001$, Rycina 51D), co prawdopodobnie obrazuje brak aktywności przeciwbólowej duloksetyny w tych zakresach temperatur.

Podanie pregabaliny w sposób istotny statystycznie zmieniało % czasu spędzanego na płytce o niższej temperaturze, w szczególności w przypadku niższych i pośrednich zestawień temperaturowych płytek tj. 5 i 10 °C ($P < 0.01$, Rycina 51B), 10 i 15 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51C),

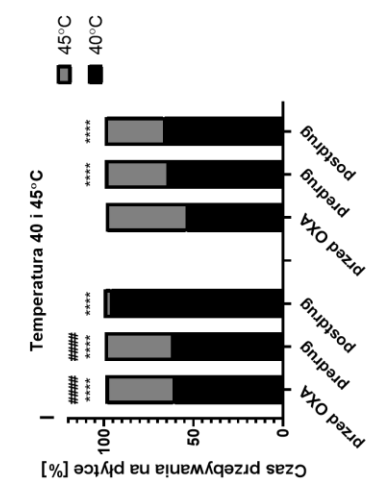
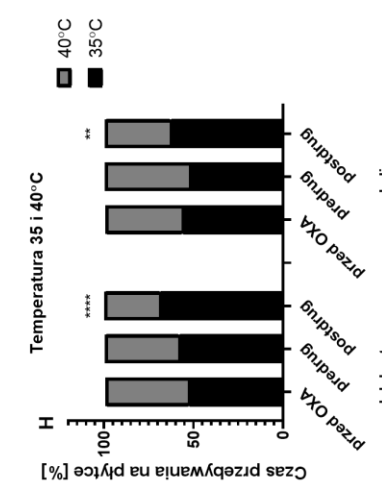
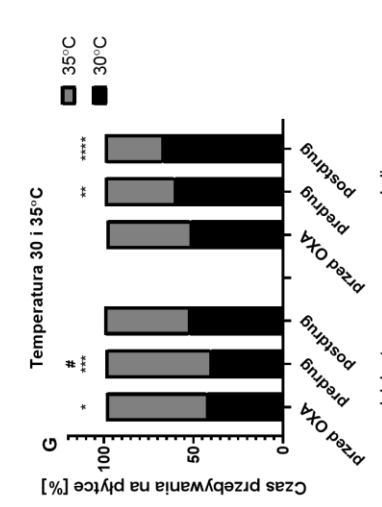
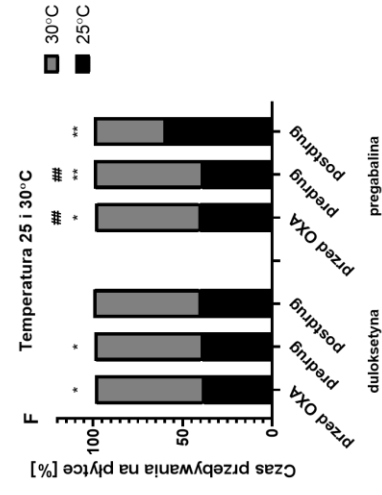
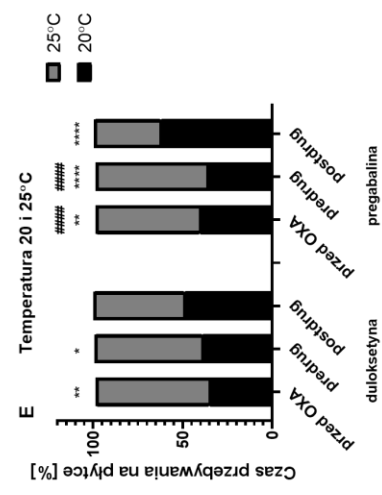
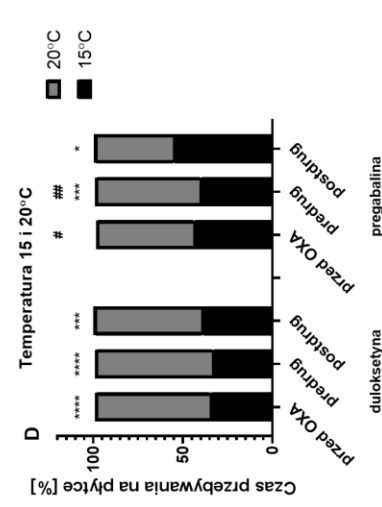
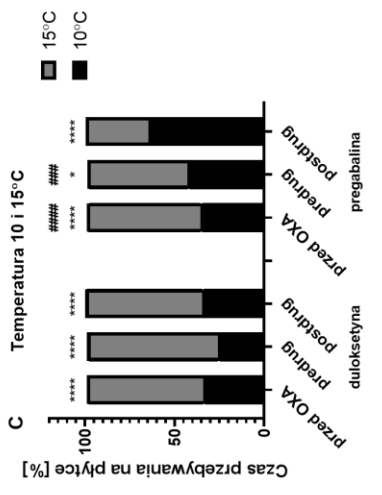
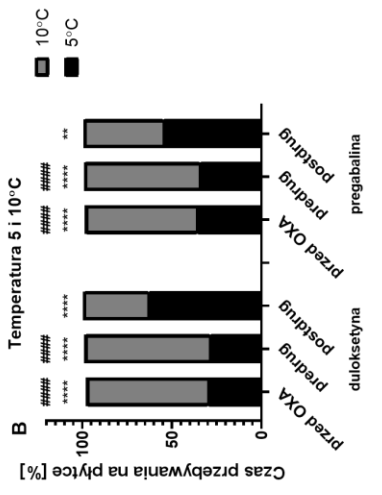
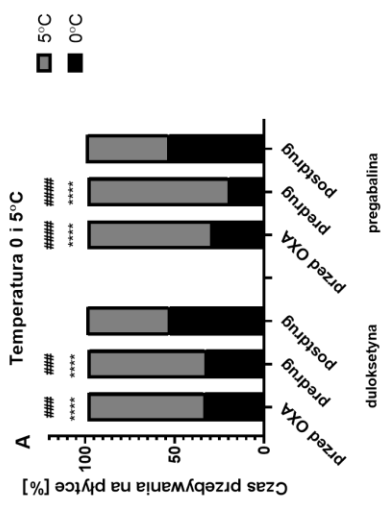
15 i 20 °C ($P < 0.05$, Rycina 51D), 20 i 25 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51E) oraz 25 i 30 °C ($P < 0.01$, Rycina 51F). Co ważne, pregabalina utrzymała preferencję zwierząt w kierunku wyboru płytek o temperaturze niższej w przypadku pomiarów wykonanych w wariantach: 30 i 35 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51G), 35 i 40 °C ($P < 0.01$, Rycina 51H) oraz 40 i 45 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51I). Otrzymane pomiary były zbliżone do wartości pomiarów przed podaniem leku. W przypadku podania pregabaliny, utrata preferencji temperaturowych została zauważona wyłącznie w grupie zwierząt umieszczanych na płytkach o temperaturze 0 i 5 °C (Rycina 51A).

Ponadto, w ramach eksperymentu porównano w każdej grupie zwierząt pomiar po podaniu oksaliplatyny oraz pomiar po podaniu leku, oznaczający wpływ leczenia na preferencję temperaturowe zwierząt. Wykazano, iż w przypadku duloksetyny istnieje statystycznie istotna różnica % czasu spędzanego na tej samej płytce po podaniu oksaliplatyny i po podaniu duloksetyny dla temperatur: 0 i 5 °C ($P < 0.001$ Rycina 51A), 5 i 10 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51B), 30 i 35 °C ($P < 0.05$, Rycina 51G) oraz 40 i 45 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51I). Efekt ten był szczególnie widoczny dla temperatur 40 i 45 °C (Rycina 51I). Taki sam efekt w przypadku pregabaliny zaobserwowano dla temperatur: 0 i 5 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51A), 5 i 10 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51B), 10 i 15 °C ($P < 0.001$, Rycina 51C), 15 i 20 °C ($P < 0.01$, Rycina 51D), 20 i 25 °C ($P < 0.0001$, Rycina 51E) oraz 25 i 30 °C ($P < 0.01$, Rycina 51F). Przy czym, należy zwrócić uwagę, iż w przypadku pregabaliny, w przeciwieństwie do duloksetyny, w temperaturze płytek 40 i 45 °C czas spędzany na tej samej płytce był marginalny.

Wyniki niniejszego eksperymentu opublikowano w pracy: Sałat, K., Furgała-Wojas, A., Awtoniuk, M., & Sałat, R. (2021). Wide-Range Measurement of Thermal Preference—A Novel Method for Detecting Analgesics Reducing Thermally-Evoked Pain in Mice. *Molecules*, 26(3), 612.

Rycina 51. Wpływ oksaliplatyny, duloksetyny i pregabaliny na termiczną preferencję u myszy.

Dwupłytkowy test preferencji termicznej przeprowadzono w różnych (9) zakresach temperatur od 0 do 45 °C. Wyniki są przedstawione jako % czas spędzony w określonej strefie termicznej mierzony w 3 różnych punktach czasowych: przed wstrzyknięciem oksaliplatyny („przed OXA”), 3 h po wstrzyknięciu oksaliplatyny („predrug”) i 1 godzinę po dootrzewnowym wstrzyknięciu duloksetyny lub pregabaliny, stosowanych w dawce 30 mg/kg („postdrug”) dla n=8–10. Analiza statystyczna: analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami i test *post hoc* Tukeya. Istotność vs. czas spędzony na drugiej płytce w tym samym punkcie czasowym badania: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001; istotność vs. czas spędzony na tej samej płytce po podaniu duloksetyny lub pregabaliny: # P<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001 i #### P<0.0001. OXA – oksaliplatyna, predrug – pomiar przed podaniem duloksetyny i pregabaliny, postdrug – pomiar po podaniu duloksetyny i pregabaliny.



5 Dyskusja

5.1 Model CIPN indukowany pojedynczym podaniem oksaliplatyny

Model oksaliplatynowy jest szeroko wykorzystywanym zwierzęcym modelem uszkodzeń układu nerwowego wywołanych przez chemioterapię. W literaturze można jednak spotkać się z różnicami w metodyce tego modelu, jak np. schematem podania jednorazowego [293] oraz wielokrotnego [324] oksaliplatyny, zastosowanego w celu indukcji zaburzeń. Pomiar nadwrażliwości termicznej wykonywany jest: stosując różną temperaturę zimnej płytki w zakresie temperatur od -4 °C do 5 °C [293], różny czas od podania chemioterapeutyku do obserwacji zmian: od 2 h, 3 h [225,325] do 7–14 dni [326] oraz obserwuje się różne reakcje zwierząt: podnoszenie, lizanie i drżenie łap, skoki, które powszechnie uznaje się za objawy wystąpienia reakcji bólowej [293]. Niekiedy stosuje się skalę numeryczną, w której 0 oznacza brak reakcji, a 2 – energiczną reakcję [225].

Stąd też, przed przystąpieniem do właściwych pomiarów oceny skuteczności analgetycznej i profilaktycznej wybranych związków i ich połączeń zwalidowano model CIPN indukowany pojedynczym podaniem oksaliplatyny. Zastosowanie różnych temperatur płytki oraz różnego czasu obserwacji po podaniu cytostatyka w pierwszym dniu eksperymentu pozwoliło na wyselekcjonowanie optymalnych warunków przeprowadzania pomiarów. Co więcej, wykonanie pomiarów po 24 h, 72 h i 7 dniach od podania chemioterapeutyku umożliwiło monitorowanie zmian zachodzących w czasie po podaniu oksaliplatyny oraz natężenia nadwrażliwości termicznej w zależności od czasu i temperatury płytki. Dzięki wykonanemu badaniu przesiewowemu najoptymalniejsze warunki zaobserwowano po 3 h od podania oksaliplatyny na płytce o temperaturze 2.5 °C. Ponadto zastosowana pojedyncza dawka tego chemioterapeutyku była wystarczająca zarówno do wywołania ostrej fazy neuropatii pierwszego dnia eksperymentu, jak również indukowania zmian odpowiedzialnych za rozwój nadwrażliwości termicznej po siedmiu dniach od wstrzyknięcia cytostatyka (Rozdział 4.1, Rycina 13).

Przedstawiona praca oraz dalsze eksperymenty potwierdzają, iż do wywołania modelu CIPN z użyciem oksaliplatyny wystarczające jest jednorazowe podanie tego leku w dawce 10 mg/kg, które indukuje zauważalne zmiany behawioralne zwierząt w teście zimnej płytki i teście von Freya oraz prowadzi do rozwoju zaburzeń charakterystycznych dla nadwrażliwości termicznej i mechanicznej w pierwszym dniu, oraz po siedmiu dniach od podania cytostatyka.

5.2 Aktywność przeciwbólowa wybranych opioidów w modelu CIPN wywołanej oksaliplatyną

Opioidowe leki przeciwbólowe są jedną z możliwości leczenia i łagodzenia objawów bólu neuropatycznego. Jednak ze względu na potencjał uzależniający, niebezpieczne działania niepożądane oraz możliwość przedawkowania, przy jednocześnie występującym ograniczonym efekcie terapeutycznym, leki z tej grupy są rzadko stosowane w leczeniu bólu neuropatycznego [327]. Obecnie poszukuje się nowych możliwości modulacji receptorów opioidowych [328] oraz modyfikuje mechanizm działania potencjalnych związków w celu poprawy bezpieczeństwa i skuteczności terapii z ich udziałem [329].

W niniejszej pracy zbadano, czy cebranopadol (Rozdział 4.2.5 i 4.3.7), jako dualny agonista receptora dla nocyceptyny oraz wszystkich receptorów opioidowych (κ , μ , δ), wykaże zdolność łagodzenia objawów nadwrażliwości termicznej w modelu neuropatii obwodowej indukowanej oksaliplatyną u myszy. Skuteczność cebranopadolu oceniono w dwóch punktach czasowych (Rozdział 4.2.5, Rycina 20) oraz w połączeniu z podaną przewlekle simwastatyną (Rozdział 4.3.7, Rycina 42).

Cebranopadol podawany podskórnie wykazał skuteczność w łagodzeniu objawów nadwrażliwości na zimno zarówno pierwszego, jak i siódmego dnia pomiarów (Rozdział 4.2.5, Rycina 20). Efekt ten był obserwowany po 90 i 120 minutach od podania. Działanie analgetyczne pierwszego dnia eksperymentu po 90 minutach od podania przewyższało działanie analgetyczne morfiny, natomiast w siódmym dniu eksperymentu w obu punktach czasowych było porównywalne do działania przeciwbólowego morfiny.

Efekt przeciwbólowy cebranopadolu może wynikać zarówno z bezpośredniego wpływu na receptory opioidowe, jak w przypadku morfiny, jak również działania agonistycznego w stosunku do receptorów nocyceptyny/orfaniny FQ, których udział w łagodzeniu objawów CIPN został potwierdzony we wcześniejszych badaniach [330].

Wykorzystanie cebranopadolu jako dodatkowej komponenty terapii w siódmym dniu wielokrotnego podania simwastatyny nie wykazało znamienego działania przeciwbólowego. Brak efektu analgetycznego najprawdopodobniej był wynikiem wielokrotnego podania simwastatyny, które prowadziło do uzyskania wysokich wartości pomiarów w siódmym dniu eksperymentu. Podanie cebranopadolu w połączeniu z simwastatyną nieznacznie wydłużało czas reakcji zwierząt w stosunku do pomiarów wykonanych przed podaniem związków, jednak efekt ten nie był istotny statystycznie (Rozdział 4.3.7, Rycina 42).

5.3 AKTYWNOŚĆ PRZECIWBÓLOWA SIMWASTATYNY W MODELU CIPN WYWOŁANEJ OKSALIPLATYNĄ

Pleiotropowe działanie simwastatyny może obejmować: poprawę funkcji śródbłonna naczyniowego, stabilizację blaszek miażdżycowych, poprawę przebudowy mięśnia sercowego, działanie przeciwzapalne, przeciwutleniające i neuroprotektoryjne oraz zmniejszenie aktywacji neuroendokrynnej. Jednak mechanizmy odpowiedzialne za wywołanie tych zmian są ciągle nieznane [331]. Jedną z teorii tłumaczących mechanizmy odpowiedzialne za działanie statyn jest redukcja ekspresji cząsteczek adhezyjnych i cytokin prozapalnych [332].

Możliwy mechanizm działania przeciwbólowego statyn może wynikać z działania immunomodulującego i hamowania powstawania czynników prozapalnych [333,334], ograniczenia cytotoxyczności i śmierci neuronów [335], działania neuroprotektoryjnego wynikającego z aktywności przeciwzapalnej i przeciwutleniającej [336], czy hamowania aktywacji komórek mikrogleju i astrocytów [337]. Z punktu widzenia neuropatii obwodowej indukowanej chemioterapią, statyny, w tym simwastatyna, mogą redukować objawy hiperalgezji i alłodyni termicznej i mechanicznej poprzez wiele różnych mechanizmów [272].

Badania nad lekiem rozpoczęto od podania simwastatyny przez 7 dni, licząc dzień pierwszy jako dzień wstrzyknięcia oksaliplatyny, aby ocenić efekt analgetyczny wielokrotnie podanej simwastatyny oraz cebranopadolu podanego w siódmym dniu (Rozdział 4.3.7, Rycina 42). Eksperyment umożliwił zaobserwowanie zmian w percepcji bólowej zwierząt

w siódmym dniu pomiarów, poprzez hamowanie rozwoju nadwrażliwości termicznej w odpowiedzi na działający bodziec bólowy po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny.

W kolejnym eksperymencie poszerzono zakres pomiarów wydłużając czas ekspozycji zwierząt na simwastatynę do 14 dni, wykonując pomiary codziennie, po podaniu leku. Przewlekłe podanie statyny wywołało silny efekt przeciwbólowy u zwierząt już w trzecim dniu podania. Efekt ten nieznacznie ulegał osłabieniu w 7-9 dniu pomiarów, po czym od 10 dnia utrzymywał się na wysokim poziomie, przewyższając wartość pomiarów uzyskanych dla grup kontrolnych (Rozdział 4.2.11.2, Rycina 32).

Należy zwrócić uwagę, iż w przypadku grup kontrolnych, czyli: grupy otrzymującej wyłącznie rozpuszczalnik, grupy otrzymującej wyłącznie simwastatynę oraz grupy, która otrzymała oksaliplatynę, a następnie przez 14 dni rozpuszczalnik zaobserwowano stopniowe skrócenie czasu reakcji w odpowiedzi na działanie bodźca termicznego. Może to być związane w przypadku zwierząt otrzymujących oksaliplatynę – z rozwojem neuropatii, a w przypadku zwierząt nieotrzymujących oksaliplatyny – z procesem uczenia [338–340].

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy potwierdzają skuteczność simwastatyny w łagodzeniu objawów nadwrażliwości termicznej jako objawu neuropatii obwodowej indukowanej chemioterapią, przy czym efekt ten widoczny jest po wielokrotnym podaniu leku w wysokiej dawce. W celu translacji badań na zwierzętach i wykorzystania simwastatyny jako potencjalnego leku łagodzącego objawy CIPN niezbędne są poszerzone badania wyznaczające dawkę efektywną u ludzi oraz oceniające bezpieczeństwo takiej terapii uwzględniające ryzyko wystąpienia działań niepożądanych, w tym miopatii.

5.4 AKTYWNOŚĆ PRZECIWBÓLOWA BEFIRADOLU W MODELU CIPN WYWOŁANEJ OKSALIPLATYNĄ

Leki nasilające neurotransmisję serotonergiczną, takie jak selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego 5-HT (np. paroksetyna, fluoksetyna, citalopram), wykazują ograniczony potencjał w leczeniu bólu neuropatycznego [154]. Jednak sama 5-HT jest ważnym modulatorem przekazywania sygnału bólowego w OUN. W oparciu o dostępne doniesienia literaturowe, aktywacja/hamowanie konkretnych podtypów receptorów serotoninowych może stanowić ciekawą i skuteczną alternatywę leczenia różnych typów bólu, w tym bólu neuropatycznego [341].

Jednym z takich receptorów jest receptor 5-HT_{1A}, którego pełna, bądź częściowa aktywacja wykazała działanie przeciwbólowe w bólu neuropatycznym [155,342]. Co ważne, aktywacja rdzeniowych receptorów postsynaptycznych 5-HT_{1A} wywołuje efekt przeciwbólowy, natomiast aktywacja nadrdzeniowych autoreceptorów 5-HT_{1A} może stymulować odczuwanie bólu [343]. Ponadto, pobudzenie receptorów 5-HT_{1A} wykazuje zdolność modulowania neurotransmisji dopaminergicznej [344].

W niniejszej pracy zbadano skuteczność agonisty receptorów 5-HT_{1A} – befiradolu (związku NLX-112). W teście zimnej płytki żadna z trzech zastosowanych dawek (1.25, 2.5 i 5 mg/kg) nie wykazała skuteczności analgetycznej (Rozdział 4.2.10, Rycina 30A). Natomiast w teście von Freya związek ten wykazał silne działanie przeciwbólowe w dawkach 2.5 i 5 mg/kg pierwszego i siódmego dnia eksperymentu (Rozdział 4.2.10, Rycina 30B).

Niniejsze badanie potwierdza możliwość wykorzystania agonisty receptorów 5-HT_{1A} w łagodzeniu niektórych objawów bólu neuropatycznego, w szczególności nadwrażliwości na bodźce mechaniczne w przebiegu CIPN.

5.5 AKTYWNOŚĆ PRZECIWBÓLOWA AMBROKSOLU I BROMHEKSYNY

Bromheksyna i ambroksolu są lekami mukolitycznymi. Bromheksyna jest lekiem, wykorzystywanym wyłącznie jako preparat wykrztuśny, natomiast ambroksol, jako aktywny metabolit bromheksyny i związek silnie hamujący VGSCs, oprócz zastosowania w leczeniu nieżytów dróg oddechowych, od niedawna jest stosowany w celu łagodzenia objawów bólu gardła [345]. Jak wcześniej wspomniano ambroksol wykazuje mechanizm działania potencjalnie skuteczny w łagodzeniu objawów bólu neuropatycznego indukowanego oksaliplatyną. Dodatkowo lek ten przenika przez barierę krew-mózg [346], a przy podaniu ogólnoustrojowym jest związkiem dobrze tolerowanym i generującym łagodne działania niepożądane [347].

Bromheksyna, tak jak ambroksol przechodzi przez barierę krew-mózg [348]. Najnowsze badania ujawniają zdolność tego leku do hamowania transbłonowej proteazy serynowej 2 (ang. *transmembrane protein serine 2*, TMPRSS2) [349], odgrywającej kluczową rolę w leczeniu infekcji wirusowych [350] oraz bólu, w tym bólu nowotworowego [351]. Z drugiej strony, najbardziej obiecującym mechanizmem działania bromheksyny jest prawdopodobnie hamowanie receptorów sigma-1 [309,310], które obecnie uważane są jako jedne z kluczowych receptorów zaangażowanych w patogenezę bólu neuropatycznego indukowanego chemioterapią [352].

W niniejszej pracy porównano skuteczność analgetyczną ambroksolu i bromheksyny podanych dootrzewnowo w tych samych dawkach. Aktywność obu leków zweryfikowano zarówno w schemacie podania jednokrotnego, jak i wielokrotnego. Dodatkowo oceniono, czy mogą one działać profilaktycznie i hamować rozwój bólowych objawów CIPN.

W teście zimnej płytki po podaniu jednorazowym leki nie wykazały istotnej statystycznie skuteczności przeciwbólowej na objawy nadwrażliwości termicznej (ambroksol: Rozdział 4.2.6.2, Rycina 22A; bromheksyna: Rozdział 4.2.7.1, Rycina 25A). Podanie wielokrotne obu leków podwyższało próg bólowy w siódmym dniu eksperymentu w teście zimnej płytki, przy czym w przypadku bromheksyny efekt ten był znacznie silniejszy. Za działanie profilaktyczne może odpowiadać sama bromheksyna lub inne niż ambroksol metabolity bromheksyny [308].

W teście von Freya podanie ambroksolu wykazało znacznie silniejsze działanie przeciwbólowe w porównaniu z bromheksyną zarówno w dawce 90 mg/kg, jak i 150 mg/kg. Zastosowanie schematu podania wielokrotnego dodatkowo potęgowało ten efekt (ambroksol: Rozdział 4.2.6.2, Rycina 22B; bromheksyna: Rozdział 4.2.7.1, Rycina 25B). Najsilniejsze działanie przeciwbólowe, hamujące objawy nadwrażliwości na bodźce mechaniczne po podaniu ambroksolu zaobserwowano pierwszego dnia pomiarów. W przypadku bromheksyny podobny efekt po podaniu jednorazowym był widoczny głównie w dawce 150 mg/kg. W schemacie podania wielokrotnego bromheksyny, najsilniejszy efekt ochronny, hamujący rozwój nadwrażliwości mechanicznej po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny widoczny był w grupie otrzymującej ten lek w najwyższej zastosowanej

dawce – 150 mg/kg. Z kolei ambroksol, podobny poziom hamowania rozwoju nadwrażliwości mechanicznej w siódmym dniu pomiarów wykazywał w dawce 90 mg/kg podawanej wielokrotnie oraz w dawce 150 mg/kg podany jednorazowo, jak i wielokrotnie (ambroksol: Rozdział 4.2.6.2, Rycina 22B; bromheksyna: Rozdział 4.2.7.1, Rycina 25B). Należy jednak pamiętać, iż dawka ambroksolu 150 mg/kg negatywnie wpływała na koordynację ruchową zwierząt w teście pręta obrotowego (Rozdział 4.4.2, Rycina 48B i C), co niewątpliwie należy wziąć pod uwagę rozważając wykorzystanie wysokich dawek tego leku w farmakoterapii bólu.

Eksperyment ujawnił, iż zarówno ambroksol, jak również bromheksyna mogą być ciekawą opcją leczenia objawów CIPN indukowanej oksaliplatyną. O ile ambroksol wykazywał silniejszy efekt w łagodzeniu objawów nadwrażliwości mechanicznej oraz działanie profilaktyczne po podaniu wielokrotnym, to bromheksyna jako jedyna po podaniu wielokrotnym hamowała rozwój nadwrażliwości termicznej i mechanicznej w siódmym dniu eksperymentu, wpływając tym samym na dwa główne objawy bólowe związane z CIPN indukowaną oksaliplatyną. Tak jak wspomniano wcześniej, efekt przeciwbólowy bromheksyny może wynikać zarówno z działania samej bromheksyny albo co bardziej prawdopodobne, biorąc pod uwagę silny efekt pierwszego przejścia dla tego leku [348], z aktywności metabolitów innych jak ambroksol powstających po podaniu ogólnoustrojowym.

5.6 OCENA SKUTECZNOŚCI PRZECIWBÓLOWEJ WYBRANYCH POŁĄCZEŃ LEKÓW W MODELU CIPN WYWOŁANEJ OKSALIPLATYNĄ

5.6.1 Aktywność przeciwbólowa duloksetyny oraz skojarzonego podania duloksetyny z ambroksolem

W farmakoterapii bólu, w szczególności w przypadkach bólu opornego na leczenie powszechnie dostępnymi lekami przeciwbólowymi, duloksetyna stanowi jeden z najczęściej stosowanych preparatów w takich schorzeniach, jak ból neuropatyczny, fibromialgia czy przewlekły ból mięśniowo-szkieletowy [193].

W eksperymentach na zwierzętach mechanizm działania duloksetyny jest ciągle badany. Oprócz dobrze udokumentowanego wpływu na wychwyty zwrotne 5-HT i NA liczne badania potwierdzają wpływ tego leku na rdzeniowe receptory α_1 -adrenergiczne [287], receptory P_2X_4 [353], modulację szlaku sygnałowego TLR4 – białko Myd88 – NF- κ B [354] oraz NGF [355].

W badaniach klinicznych duloksetyna charakteryzuje się zadowalającą skutecznością i bezpieczeństwem stosowania w różnych rodzajach bólu [356–359]. Co ciekawe, coraz częstszym zjawiskiem staje się terapia skojarzona, której składową jest duloksetyna [360–362]. Takie podejście jest próbą potencjalizacji skuteczności terapeutycznej dostępnych leków oraz osiągnięcie odpowiedniego poziomu łagodzenia bólu w przypadku stwierdzonej lekooporności.

W niniejszej pracy podanie duloksetyny w dawce 30 mg/kg łagodziło objawy nadwrażliwości termicznej mierzonej w teście zimnej płytki, a dodatkowo zastosowane podanie wielokrotne hamowało rozwój nadwrażliwości termicznej w siódmym dniu pomiarów wykazując ochronne działanie tego leku (Rozdział 4.2.1.1, Rycina 14A). W teście von Freya podanie duloksetyny w dawkach 10 i 30 mg/kg wykazało istotny wpływ łagodzący objawy

nadwrażliwości mechanicznej, który dodatkowo potęgowało podanie wielokrotne. Działanie ochronne na rozwój nadwrażliwości mechanicznej w siódmym dniu eksperymentu zaobserwowano zarówno przy jednorazowym, jak i wielokrotnym podaniu obu dawek leku (Rozdział 4.2.1.1, Rycina 14B). Niniejsze wyniki potwierdziły wysoką skuteczność analgetyczną duloksetyny w łagodzeniu i profilaktyce bólu neuropatycznego indukowanego oksaliplatyną. Aczkolwiek, należy zwrócić uwagę na fakt, iż podanie duloksetyny w dawkach 10 mg/kg (w siódmym dniu podania jednorazowego) i 30 mg/kg istotnie statystycznie zaburzało koordynację ruchową zwierząt w teście pręta obrotowego (Rozdział 4.4.5, Tabela 3).

W ramach kolejnego etapu badań skojarzono podanie duloksetyny i ambroksolu w modelu CIPN indukowanej oksaliplatyną. W tym schemacie podania w teście zimnej płytki (Rozdział 4.3.1, Rycina 34A) żadne z połączeń nie wykazało istotnej statystycznie skuteczności analgetycznej, co więcej jednocześnie podana duloksetyna w dawce 30 mg/kg w połączeniu z ambroksolem w dawce 90 mg/kg wywołała silny efekt toksyczny, uniemożliwiający przeprowadzenie testów behawioralnych w pierwszym dniu eksperymentu. W teście von Freya, część połączeń wykazała znamienne łagodzenie nadwrażliwości mechanicznej (Rozdział 4.3.1, Rycina 34B). Efekt ten nie wynikał z rozwijającego się w czasie działania przeciwbólowego duloksetyny, które zweryfikowano w kolejnym etapie eksperymentu (Rozdział 4.3.1.1, Rycina 35B).

Ciekawym zjawiskiem zaobserwowanym w ramach tego doświadczenia był efekt toksyczny po podaniu jednoczesnym leków. Działanie toksyczne połączenia duloksetyny i ambroksolu mogło wynikać z rozwoju zespołu serotoninowego, gdyż oba związki prawdopodobnie mogą nasilać transmisję serotonergiczną [307,357], co częściowo potwierdzały zaobserwowane objawy u zwierząt.

5.6.2 Aktywność przeciwbólowa skojarzonego podania pregabaliny z ambroksolem

Mechanizm działania pregabaliny opiera się na łączeniu z podjednostką $\alpha_2\delta-1$ VGCCs. Ostatnie badania wskazują na oddziaływanie podjednostki $\alpha_2\delta-1$ z receptorami dla glutaminianu NMDAR tworząc kompleks, który odgrywa kluczową rolę w rozwoju bólu neuropatycznego i działaniu terapeutycznym gabapentynoidów [363]. Podjednostka ta zmienia również skład podjednostek synaptycznych receptorów glutaminianu typu AMPA (AMPA). Wynika z tego, że leki jak gabapentyna i pregabalina, oddziałujące z podjednostką $\alpha_2\delta-1$ modulują plastyczność synaptyczną w bólu neuropatycznym i przywracają prawidłowe funkcje synaptyczne [364]. Co ważne, w modelu CIPN indukowanej paklitakselem wykazano, iż podjednostka $\alpha_2\delta-1$ jest niezbędna do pobudzenia presynaptycznych NMDAR w rdzeniu kręgowym, a poziom ekspresji podjednostki $\alpha_2\delta-1$ zwiększa się w wyniku podawania chemioterapii. Stąd też, zasadne okazuje się „celowanie terapeutyczne” w kompleks $\alpha_2\delta-1$ -NMDAR w leczeniu bólu neuropatycznego indukowanego chemioterapią [365].

Pregabalina wykazuje skuteczność w łagodzeniu niektórych objawów bólu neuropatycznego, jednakże stosowane wysokie dawki zwiększają ryzyko wystąpienia działań niepożądanych, co może prowadzić do zaprzestania terapii [366]. Z drugiej strony, skuteczność pregabaliny jest wysoka u zwierząt [367] natomiast u ludzi lek ten wykazuje słabsze działanie, które dodatkowo jest limitowane przez występujące działania niepożądane [368,369].

Ambroksol jest dobrze znanym lekiem mukolitycznym, wykorzystywanym od wielu lat w różnego typu schorzeniach układu oddechowego. Oprócz skuteczności w leczeniu nieżytów dróg oddechowych, ambroksol hamuje VGSCs, w szczególności izoformę $Na_v1.8$ i $Na_v1.7$ [370–373]. Dodatkowo wykazuje zdolność hamowania VGCCs, AMPAR, hamuje aktywację cykazy guanylanowej [373,374], jest antagonistą receptorów 5-HT₃ oraz jest inhibitorem transportera wychwytu zwrotnego 5-HT (SERT) [307]. Lek ten ma również działanie przeciwzapalne, obniżając stężenie cytokin prozapalnych [375]. Dodatkowo wykazano, iż ambroksol powodował 40% hamowanie NMDAR w miejscu glicynowym [307].

Wpływ ambroksolu na VGSCs, kilkukrotnie silniejszy niż w przypadku lidokainy, jest od kilkunastu lat wykorzystywany w leczeniu i łagodzeniu różnych objawów bólowych, w szczególności w preparatach stosowanych miejscowo [376,377]. Z uwagi na fakt, iż nadekspresja VGSCs jest kluczowym mechanizmem rozwoju wczesnej fazy bólu neuropatycznego indukowanego oksaliplatyną wykorzystanie ambroksolu w niniejszych badaniach było uzasadnionym i interesującym krokiem w poszukiwaniu skutecznego leczenia łagodzącego objawy neuropatii [23].

W niniejszej pracy zbadano skuteczność podania skojarzonego pregabaliny wraz z ambroksolem. W ramach pierwszego etapu badań udało się ustalić dawkę aktywną i podprogową zarówno dla ambroksolu, jak i dla pregabaliny. Ambroksol podawany dożylnie wykazał skuteczność w dawce 37.5 mg/kg (Rozdział 4.2.6.1, Rycina 21), natomiast pregabalina podawana dootrzewnowo wykazała skuteczność w dawce 30 mg/kg (Rozdział 4.2.2, Rycina 17).

W schemacie podania skojarzonego połączenie pregabaliny i ambroksolu wykazało skuteczność w łagodzeniu objawów nadwrażliwości termicznej pierwszego dnia eksperymentu, osiągając najwyższy efekt przeciwbólowy dla dawek podprogowych przebadanych po 4 h od podania pregabaliny (Rozdział 4.3.2, Rycina 36). Co ciekawe, zastosowane połączenie leków w dawkach podprogowych wykazało skuteczność również w siódmym dniu pomiarów, stosując ten sam schemat podania leków.

Dostępne dane literaturowe wskazują, na kluczowy udział kanałów VGSCs i VGCCs w rozwoju wczesnej fazy neuropatii indukowanej oksaliplatyną [23]. Działanie analgetyczne, jakie osiągnięto w pierwszym dniu eksperymentu poprzez hamowanie tych kanałów podając pregabalinę i ambroksol potwierdza te doniesienia. Dodatkowo należy podkreślić, że w przypadku pregabaliny w dawce 10 mg/kg efekt przeciwbólowy w łagodzeniu nadwrażliwości termicznej na niską temperaturę nie wystąpił w żadnym z punktów czasowych zastosowanych w ramach pomiarów uzupełniających (od 1 h do 12 h od podania leku; Rozdział 4.3.2.1, Rycina 37A). W przypadku ambroksolu działanie analgetyczne wystąpiło wyłącznie po 30 minutach od podania w wysokiej dawce 37.5 mg/kg (Rozdział 4.3.2.1, Rycina 37B).

Biorąc pod uwagę przeprowadzone eksperymenty, można zatem wyciągnąć wniosek, iż działanie przeciwbólowe pregabaliny i ambroksolu podawanych w skojarzeniu z zastosowaniem odstępu czasowego nie wynikało z efektu przeciwbólowego samej pregabaliny, ani samego ambroksolu. Stanowiło synergistyczny efekt analgetyczny zastosowania obu leków razem. Jest to ciekawa i znacząca obserwacja, warta rozważenia w terapii CIPN.

5.6.3 Aktywność przeciwbólowa amitryptyliny i skojarzonego podania amitryptyliny z ambroksolem

Mechanizm działania amitryptyliny, który może przyczyniać się do skuteczności tego leku w łagodzeniu objawów bólu neuropatycznego obejmuje: hamowanie wychwytu zwrotnego 5-HT i NA, blokowanie VGSCs i VGCCs oraz działanie antagonistyczne na NMDAR [378]. W badaniach na myszach głównym mechanizmem przeciwbólowego działania amitryptyliny w modelu CIPN, jest hamowanie izoformy $Na_v1.7$, $Na_v1.8$, $Na_v1.9$ VGSCs oraz indukowanie mobilizacji jonów wapniowych poprzez aktywację kanałów TRPA1. Amitryptylina jest jednym z leków dopuszczonych do leczenia bólu neuropatycznego o różnej etiologii, jednak dane literaturowe dotyczące jej stosowania w bólu w przebiegu CIPN są niejednoznaczne [189].

W lecznictwie amitryptylina stosowana jest często miejscowo w preparatach o wysokim stężeniu [188]. Dostępne są też połączenia amitryptyliny z innymi lekami jak m.in. baklofenem i ketaminą [379,380]. Stosowanie takich połączeń nie wpływa na zmniejszenie efektywności podawanej chemioterapii i charakteryzuje się dobrą skutecznością oraz brakiem objawów niepożądanych, zarówno miejscowych, jak i ogólnoustrojowych [189]. Co ciekawe, w niedawno przeprowadzonym dużym badaniu klinicznym u pacjentów z CIPN wywołaną oksaliplatyną, amitryptylina, obok pregabaliny i gabapentyny była jednym z leków stosowanych w łagodzeniu objawów bólowych, co dodatkowo potwierdza jej potencjał w łagodzeniu objawów bólu neuropatycznego [381].

W zaprojektowanym eksperymencie aktywność amitryptyliny została oceniona w trzech dawkach: 1, 2.5 i 10 mg/kg. Skuteczność analgetyczną w teście zimnej płytki wykazały dawki: 2.5 i 10 mg/kg, przy czym efekt ten był widoczny wyłącznie pierwszego dnia eksperymentu (Rozdział 4.2.3, Rycina 18). Za efekt przeciwbólowy prawdopodobnie odpowiada modulacja VGSCs, które są zaangażowane w rozwój ostrej fazy neuropatii [382].

W ramach badań oceniono również wpływ skojarzonego podania amitryptyliny i ambroksolu na próg reaktywności bólowej u myszy z neuropatią wywołaną oksaliplatyną. Zastosowane połączenie leków nie wykazało jednak skuteczności analgetycznej (Rozdział 4.3.3, Rycina 38).

5.6.4 Aktywność przeciwbólowa lakoamidu oraz skojarzonego podania lakoamidu z ambroksolem i pregabalina

Profil działania lakoamidu na VGSCs, w porównaniu do wcześniej wykorzystywanych w badaniach leków jest inny, co nadaje mu unikalne właściwości. Specyficzne działanie tego leku opiera się na wysokiej selektywności wobec powolnej fazy inaktywacji prądów sodowych [383] bez wpływu na szybką inaktywację [384]. Dodatkowo lakoamid wykazuje zdolność reagowania z CRMP-2, które jest zaangażowane w wiele szlaków związanych z bólem [299,384].

Badania *in vitro* CRMP-2 sugerują udział tego białka w ochronie neuronów przed ekscytotoksycznością i apoptozą [299]. Dodatkowo uważa się, że CRMP-2 odgrywa ważną rolę w migracji kanałów jonowych bramkowanych napięciem w szczególności VGCCs ($Ca_v2.2$) oraz VGSCs ($Na_v1.7$), które może obecnie być potencjalnym celem terapeutycznym w poszukiwaniu nowych skutecznych leków w leczeniu bólu neuropatycznego [385]. Takie podejście potwierdzają również badania fosforylacji CRMP-2 za pośrednictwem zależnej

od cyklin kinazy 5 (Cdk5), która okazuje się niezbędnym, a jednocześnie wystarczającym procesem w celu wywołania bólu neuropatycznego [386].

Biorąc pod uwagę zakres aktywności prezentowanych przez lakozamid, wykorzystanie tego leku jako potencjalnie skutecznego w łagodzeniu objawów bólu neuropatycznego wydaje się uzasadnioną i ciekawą opcją terapii. W niniejszej pracy zbadano potencjalną skuteczność analgetyczną lakozamidu w połączeniu z pregabaliną – lekiem hamującym VGCCs i ambroksolem – lekiem hamującym VGSCs oraz transmisję serotonergiczną.

Lakozamid podawany samodzielnie wykazał skuteczność w łagodzeniu nadwrażliwości termicznej w dawce 30 mg/kg, w pierwszym dniu eksperymentu. W teście von Freya skuteczne okazały się obie przebadane dawki tego leku (10 i 30 mg/kg), wykazując proporcjonalne do zastosowanej dawki działanie analgetyczne (Rozdział 4.2.4, Rycina 19).

W schemacie skojarzonego podania lakozamidu i ambroksolu w teście zimnej płytki żadne z zaproponowanych połączeń oraz podań z odstępem czasowym nie wykazało skuteczności w łagodzeniu nadwrażliwości termicznej wywołanej oksaliplatyną (Rozdział 4.3.4, Rycina 39A). W teście von Freya istotne statystycznie działanie analgetyczne na objawy nadwrażliwości zwierząt na bodźce mechaniczne wykazały wszystkie zastosowane połączenia lakozamidu z ambroksolem, przy czym efekt ten był silniej zaznaczony pierwszego, jak siódmego dnia eksperymentu (Rozdział 4.3.4, Rycina 39B). Należy jednak zwrócić uwagę, iż skojarzone podanie lakozamidu w dawce 30 mg/kg i ambroksolu w dawce 90 mg/kg wykazało też negatywny wpływ na koordynację ruchową zwierząt w teście pręta obrotowego (Rozdział 4.4.6, Tabela 4).

W schemacie skojarzonego podania pregabaliny i lakozamidu w teście zimnej płytki skuteczność analgetyczną wykazało wyłącznie połączenie pregabaliny w wysokiej dawce - 30 mg/kg z lakozamidem w dawce 10 mg/kg w schemacie podania jednoczesnego (Rozdział 4.3.5, Rycina 40A). Efekt ten najprawdopodobniej wynika z aktywności pregabaliny podanej w dawce 30 mg/kg, która we wcześniejszym eksperymencie w zastosowanej dawce wykazała aktywność analgetyczną (Rozdział 4.2.2, Rycina 17). W teście von Freya zastosowane połączenia leków wykazały istotne statystycznie działanie przeciwbólowe pierwszego i siódmego dnia pomiarów we wszystkich grupach z wyjątkiem pomiaru wykonanego po 12 h od podania pregabaliny. W tych grupach istotne statystycznie działanie podwyższające próg bólowy zostało zaobserwowane wyłącznie w pierwszym dniu eksperymentu (Rozdział 4.3.5, Rycina 40B).

Podsumowując, badania te wykazały, iż jednoczesne hamowanie VGSCs i VGCCs skutkuje silnym efektem przeciwbólowym w modelu CIPN indukowanej oksaliplatyną. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy sugerują, że lakozamid może być potencjalnie skutecznym lekiem łagodzącym objawy neuropatii obwodowej, natomiast dzięki terapii skojarzonej z użyciem leków w niższych dawkach możliwe jest uzyskanie silniejszego efektu przeciwbólowego przy niższym prawdopodobieństwie rozwoju działań niepożądanych, w porównaniu do monoterapii wysokimi dawkami leków.

5.6.5 Aktywność przeciwbólowa aripirazolu i ceftriaksonu oraz skojarzonego podania aripirazolu z ceftriaksonem

Uważa się, że układ dopaminergiczny, a w szczególności wpływ na receptory D₂, stanowi jedną z możliwych opcji leczenia bólu neuropatycznego [171,387], a dysregulacja dopaminergiczna

jest częstym zjawiskiem współwystępującym z rozwijającym się uszkodzeniem nerwów [172,388]. Zjawisko to jest wykorzystywane w poszukiwaniu nowych leków, skutecznych w łagodzeniu objawów bólu neuropatycznego [389]. Jednoczesne oddziaływanie przez receptory dopaminowe D₂/D₃ oraz serotoninowe 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} przyczynia się do modulacji bólu [390]. Takie działanie wykazuje aripiprazol, który oprócz modulacji receptorów D₂, jest również częściowym agonistą receptorów 5-HT_{1A} [391] i antagonistą receptorów 5-HT_{2A} [392]. W modelu winkrystynowym aripiprazol hamował rozwój CIPN [174], natomiast w leczeniu lek ten wykorzystuje się w łagodzeniu bólu o różnej etiologii jako związek adjuwantowy stosowany w niskich dawkach [312,393].

Układ glutaminianergiczny jest ciekawym i jak do tej pory praktycznie niewykorzystywanym celem terapeutycznym w leczeniu bólu o różnej etiologii. Jak wiadomo, glutaminian jest jednym z kluczowych neurotransmiterów pobudzających w OUN, który uczestniczy w sensytyzacji ośrodkowej i wzmacnianiu transmisji bólu [314,394] odgrywając istotną rolę w szczególności w bólu przewlekłym [395].

Lekiem, którego potencjał w leczeniu różnych schorzeń neurologicznych, w tym bólu, nie został do tej pory dogłębnie oceniony, jest ceftriakson. Związek ten poprzez zwiększenie ekspresji głównego transportera dla glutaminianu (GLT-1) zmniejsza ilość tego neuroprzekaźnika w szczelinie synaptycznej ograniczając jego działanie [313]. Ceftriakson w oparciu o unikalny mechanizm działania próbuje się obecnie wykorzystać w leczeniu takich schorzeń jak choroba Parkinsona i Alzheimer, choroba Huntingtona, stwardnienie zanikowe boczne oraz udar [313].

We wcześniejszym eksperymencie udało się wykazać, iż modulacja receptorów 5-HT_{1A} przez befiradol może łagodzić objawy nadwrażliwości mechanicznej w modelu CIPN indukowanej oksaliplatyną. W przeprowadzonym eksperymencie poszerzono zakres jednocześnie modulowanych układów poprzez podanie aripiprazolu i ceftriaksonu osobno oraz w połączeniu, w schemacie podania jednorazowego i wielokrotnego.

W teście zimnej płytki (Rozdział 4.2.8, Rycina 28A) skuteczność analgetyczną wykazał aripiprazol podawany w dawce 10 mg/kg, co może świadczyć, iż w rozwój i łagodzenie objawów nadwrażliwości termicznej może być zaangażowany układ dopaminergiczny i serotonergiczny przez podtypy receptorów serotoninowych, takie jak 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}. Jednocześnie należy zwrócić uwagę, iż wysoka zastosowana dawka aripiprazolu silnie zaburzała aktywność lokomotoryczną zwierząt (Rozdział 4.4.3, Rycina 49A), co może wskazywać na otrzymanie wyników fałszywie pozytywnych w teście zimnej płytki. W przypadku ceftriaksonu nie zaobserwowano aktywności analgetycznej w teście zimnej płytki, zarówno w schemacie podania jednorazowego, jak i wielokrotnego (Rozdział 4.2.9, Rycina 29A).

W teście von Freya oba leki wykazały istotną statystycznie i zbliżoną aktywność przeciwbólową, przy czym wielokrotne podanie ceftriaksonu w dawce 200 mg/kg (Rozdział 4.2.9, Rycina 29B) dodatkowo hamowało rozwój nadwrażliwości mechanicznej w siódmym dniu eksperymentu. Aripiprazol, nie wykazał takiej aktywności. Ponadto ceftriakson nie wpływał negatywnie na aktywność lokomotoryczną i koordynację ruchową zwierząt (Rozdział 4.4.3 i 4.4.4). Otrzymane wyniki potwierdzają doniesienia o możliwym zaangażowaniu układu glutaminianergicznego w rozwój i utrwalenie bólu [395,396].

Podanie leków w skojarzeniu (Rozdział 4.3.6, Rycina 41) wykazało znamienny wpływ na łagodzenie objawów nadwrażliwości mechanicznej i nieznaczny wpływ na objawy nadwrażliwości termicznej oraz jednocześnie zaburzało koordynację ruchową i aktywność lokomotoryczną zwierząt (Rozdział 4.4.3 i 4.4.4). Świadczy to prawdopodobnie o innych mechanizmach zaangażowanych w rozwój zwiększonej wrażliwości na niską temperaturę w przebiegu CIPN niż te modulowane podaniem aripirazolu i ceftriaksonu.

Podsumowując, ceftriakson stanowi ciekawą opcję leczenia i łagodzenia objawów nadwrażliwości mechanicznej występującej w przebiegu CIPN, jednak stosowanie tego leku jako preparatu przeciwbólowego może być ograniczone z uwagi na inne właściwości farmakologiczne (aktywność przeciwbakteryjna i ryzyko rozwoju antybiotykooporności przy długotrwałym stosowaniu). Lek ten natomiast jest ciekawą opcją jako struktura wiodąca w poszukiwaniu innych związków o tym samym mechanizmie działania, uwzględniającym wpływ na transmisję glutaminianergiczną (transporter GLT-1), ale pozbawionych właściwości przeciwbakteryjnych. Takie struktury miałyby istotne znaczenie w leczeniu i profilaktyce bólu neuropatycznego. Natomiast, częściowy agonizm do receptorów dopaminergicznych, wykazany dla aripirazolu nie wydaje się użyteczny w łagodzeniu objawów bólu neuropatycznego indukowanego chemioterapią.

5.6.6 Aktywność przeciwbólowa minocykliny oraz skojarzonego podania minocykliny z duloksetyną i ambroksolem

Minocyklina – antybiotyk tetracyklinowy stanowi potencjalną opcję farmakoterapii bólu. Jak wiadomo, jednym z kluczowych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój bólu neuropatycznego jest neurozapalenie [397,398]. Minocyklina, dzięki silnym właściwościom lipofilowym, wykazuje zdolność przechodzenia przez barierę krew-mózg, gdzie działa przeciwzapalnie, antyoksydacyjnie oraz neuroprotekcjnie [323]. We wcześniejszych badaniach na zwierzętach, minocyklina osłabiała hiperalgezę indukowaną podaniem paklitakselu [399] i oksaliplatyny [400]. W niniejszej pracy postanowiono zweryfikować skuteczność analgetyczną minocykliny podanej samodzielnie oraz w połączeniu z duloksetyną i ambroksolem na objawy CIPN indukowanej oksaliplatyną.

W modelu oksaliplatynowym, podanie minocykliny w dawkach 50 i 100 mg/kg nie osłabiało nadwrażliwości na bodźce termiczne, jednak wielokrotne podanie tego leku w dawce 100 mg/kg hamowało rozwój nadwrażliwości termicznej w siódmym dniu eksperymentu (Rozdział 4.2.12, Rycina 33A). Z kolei minocyklina w dawkach 50 i 100 mg/kg podana zarówno jednorazowo, jak i wielokrotnie wykazała silny efekt przeciwbólowy w teście von Freya. Efekt ten był najsilniejszy dla dawki 100 mg/kg (Rozdział 4.2.12, Rycina 33B).

W literaturze dostępne są dane dokumentujące potencjalizację działania analgetycznego skojarzonego podania minocykliny z takimi lekami jak: indometacyną [288], miejscowo podawanym tramadolem [401] czy toksyną botulinową [402] w różnych modelach bólu. W niniejszej pracy podjęto próbę oceny skuteczności analgetycznej połączenia minocykliny z duloksetyną oraz ambroksolem. Leki te zostały podane zarówno w schemacie podania jednorazowego i wielokrotnego oraz w skojarzeniu z zastosowanym odstępem czasowym.

W ramach przeprowadzonych pomiarów, z zastosowanym odstępem czasowym podania leków, tj. minocykliny z ambroksolem (Rozdział 4.3.8.1, Rycina 43A) oraz minocykliny z duloksetyną (Rozdział 4.3.8.2, Rycina 44A) nie wykazano istotnej statystycznie aktywności przeciwbólowej w teście zimnej płytki. Podanie minocykliny w dawce 100 mg/kg z ambroksolem w dawce 90 mg/kg (Rozdział 4.3.8.1, Rycina 43B) w teście von Freya hamowało nadwrażliwość na bodźce mechaniczne zarówno, gdy leki te zostały przebadane po 1 h (podanie jednoczesne) oraz po 4 h, 6 h i 12 h od podania minocykliny. W teście von Freya w grupie otrzymującej minocyklinę i duloksetynę (Rozdział 4.3.8.2, Rycina 44B) najsilniejsze działanie przeciwbólowe zaobserwowano dla grup otrzymujących minocyklinę w dawce 100 mg/kg i podprogową dawkę duloksetyny – 10 mg/kg wykonując pomiar po 6 h i 12 h od podania minocykliny.

Wykonane badanie uzupełniające umożliwiło zauważyć, iż podanie minocykliny wykazywało działanie łagodzące objawy nadwrażliwości na bodźce mechaniczne obserwowane do 12 h po wstrzyknięciu dootrzewnowym w pierwszym dniu eksperymentu (dawka 50 mg/kg) oraz pierwszego i siódmego dnia pomiarów w przypadku dawki 100 mg/kg (Rozdział 4.3.8.4, Rycina 46B).

Podanie wielokrotne leków w teście zimnej płytki hamowało rozwój nadwrażliwości termicznej w siódmym dniu eksperymentu wyłącznie w grupie otrzymującej połączenie minocykliny i duloksetyny (Rozdział 4.3.8.3, Rycina 45A). W teście von Freya wszystkie zastosowane połączenia leków wykazały istotną statystycznie skuteczność w łagodzeniu objawów nadwrażliwości mechanicznej. Ponadto, po podaniu wielokrotnym minocykliny z ambroksolem i duloksetyną zaobserwowano działanie hamujące rozwój nadwrażliwości mechanicznej w siódmym dniu eksperymentu. Porównując oba połączenia lekowe, silniejszy efekt ochronny na rozwój nadwrażliwości mechanicznej w siódmym dniu eksperymentu widoczny był w grupach otrzymujących minocyklinę w połączeniu z ambroksolem, a efekt przeciwbólowy zastosowanego połączenia leków w grupach otrzymujących skojarzone podanie minocykliny z duloksetyną (Rozdział 4.3.8.3, Rycina 45B).

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy potwierdzają potencjał wykorzystania minocykliny w leczeniu i łagodzeniu objawów CIPN indukowanej oksaliplatyną. Zarówno minocyklina podawana wielokrotnie (100 mg/kg), jak również połączenie minocykliny z duloksetyną wpływały ochronnie na rozwój nadwrażliwości termicznej i mechanicznej w siódmym dniu eksperymentu, bez jednoczesnego negatywnego wpływu na koordynację ruchową zwierząt (Rozdział 4.4.5, Tabela 3). Dodatkowo biorąc pod uwagę uzyskane wcześniej wyniki aktywności przeciwbólowej duloksetyny, która charakteryzuje się szybkim początkiem działania oraz minocykliny wykazującej działanie długotrwałe, zasadne wydaje się zalecenie skojarzonego podania obu leków w celu szybkiego i długo utrzymującego się efektu przeciwbólowego.

5.7 ZAPOBIEGANIE ROZWOJU CIPN– SCHEMAT PODANIA PROFILAKTYCZNEGO

5.7.1 Profilaktyczne podanie duloksetyny

Profilaktyka bólu neuropatycznego, w szczególności bólu będącego powikłaniem CIPN, jest z jednej strony podejściem uzasadnionym i koniecznym, z drugiej strony niezwykle problematycznym i budzącym liczne kontrowersje oraz obawy. Terapia przeciwnowotworowa ma na celu zahamowanie rozwoju i progresji nowotworu, umożliwiając wyleczenie, bądź przedłużenie życia pacjenta. Jednakże często jako efekt uboczny leczenia onkologicznego objawy CIPN w intensywny i przykry sposób ograniczają normalne funkcjonowanie oraz jakość życia osób w remisji. Pomimo tego, iż podczas terapii onkologicznej znamy czynnik indukujący zmiany, dokładny czas podania, dawkę preparatów, mechanizm działania użytych leków oraz dysponujemy literaturą opisującą prawdopodobne mechanizmy zaangażowane w rozwój takich uszkodzeń jak CIPN, do tej pory nie udało się odkryć skutecznego postępowania profilaktycznego. Pomimo licznych prób i licznych nowych związków przebadanych pod kątem zapobiegania rozwojowi CIPN indukowanej przez różne cytostatyki, najbardziej obiecujące efekty zostały osiągnięte dla duloksetyny. Inne leki i związki obecnie są nierekomendowane jako profilaktyka CIPN, a badania nad nowymi potencjalnymi lekami ciągle trwają i są na różnym etapie badań klinicznych [246].

Duloksetyna w leczeniu bólu neuropatycznego jest lekiem skutecznym i stosunkowo bezpiecznym [287,403]. W profilaktyce CIPN lek ten rozważany jest jako potencjalnie aktywny związek zapobiegający rozwojowi bólu neuropatycznego [244], jednak ciągle brak jest badań w pełni potwierdzających i dokumentujących skuteczność duloksetyny w hamowaniu progresji i narastania neuropatii obwodowej. Obecnie rozpoczęte duże badanie kliniczne oceniające skuteczność duloksetyny podawanej profilaktycznie w celu zapobiegania CIPN indukowanej oksaliplatyną jest w trakcie rekrutowania pacjentów (NCT04137107) [404]. Z kolei dostępne inne badanie kliniczne wykazało, iż duloksetyna prezentuje wysoką skuteczność jako lek stosowany profilaktycznie w neuropatii obwodowej indukowanej oksaliplatyną, z jednocześnie niską toksycznością i wysokim stopniem bezpieczeństwa stosowania [405].

Rozważając poniższe fakty oraz analizując wyniki badań własnych, sprawdzono skuteczność podania profilaktycznego duloksetyny w modelu CIPN, stosując w tym celu dwa schematy podania: podanie jednorazowe oraz wielokrotne.

W schemacie profilaktyki jednorazowej w teście zimnej płytki podanie duloksetyny w dawce 30 mg/kg przed podaniem oksaliplatyny istotnie wydłużało czas wystąpienia reakcji bólowej w teście zimnej płytki w pierwszym dniu eksperymentu w stosunku do pomiaru grupy kontrolnej (Rozdział 4.2.1.2, Rycina 15A). W teście von Freya już niższa zastosowana dawka (10 mg/kg) wywoływała taki efekt, przy czym duloksetyna podana profilaktycznie w dawce 30 mg/kg wywoływała silny efekt ochronny na rozwój nadwrażliwości mechanicznej w pierwszym dniu po podaniu oksaliplatyny, który utrzymywał się do siódmego dnia pomiarów. W pierwszym dniu testu efekt ten przewyższał wartość pomiarów otrzymanych dla zwierząt grupy kontrolnej, które nie otrzymały oksaliplatyny (Rozdział 4.2.1.2, Rycina 15B).

W schemacie profilaktyki wielokrotnej duloksetyna nie wykazywała działania ochronnego na rozwój nadwrażliwości termicznej w teście zimnej płytki w pierwszym dniu po podaniu oksaliplatyny (Rozdział 4.2.1.2, Rycina 16A). Jednak wielokrotnie podana duloksetyna w dawce 10 mg/kg hamowała rozwój nadwrażliwości termicznej po siedmiu

dniach od podania cytostatyka. Co ciekawe, taki efekt nie został zaobserwowany dla wyższej dawki duloksetyny (Rozdział 4.2.1.2, Rycina 16A). Z kolei w teście von Freya podanie wielokrotne wywołało silny efekt ochronny, zarówno w dawce 10 mg/kg, jak i 30 mg/kg. Dawka niższa duloksetyny – 10 mg/kg hamowała rozwój nadwrażliwości mechanicznej po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny, natomiast dawka wyższa – 30 mg/kg podana wielokrotnie zapobiegała rozwojowi nadwrażliwości mechanicznej (Rozdział 4.2.1.2, Rycina 16B).

Zastosowany schemat podania profilaktycznego duloksetyny potwierdził potencjał ochronny tego leku wobec rozwoju objawów zarówno nadwrażliwości termicznej, jak i mechanicznej w pierwszym i siódmym dniu pomiarów w przypadku neuropatii obwodowej indukowanej oksaliplatyną. Efekt ten widoczny był w szczególności w odniesieniu do nadwrażliwości mechanicznej – zarówno w modelu podania jednorazowego, jak i wielokrotnego podając duloksetynę w dawce 30 mg/kg.

Obecnie nie stwierdzono jednoznacznie, który z mechanizmów działania duloksetyny jest odpowiedzialny za potencjalne działanie ochronne i hamowanie progresji i rozwoju objawów CIPN. Meng i wsp. wykazali, iż duloksetyna hamuje aktywację fosforylacji kinazy p38, zapobiegając w ten sposób aktywacji NF- κ B, zmniejszając odpowiedź zapalną oraz hamując uszkodzenie nerwów poprzez regulację NGF, jednocześnie nie zmniejszając skuteczności terapii przeciwnowotworowej [195]. Kato i wsp. za mechanizm profilaktyczny duloksetyny uważają zdolność tłumienia regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym fosforylacji kinazy ERK1/2 [406].

Ważnym mechanizmem zaangażowanym w działanie neuroprotekcyjne duloksetyny okazuje się też wpływ na transporter OCT2, którego farmakologiczna modyfikacja może łagodzić ostre i przewlekłe objawy neurotoksyczności [407]. Duloksetyna okazuje się inhibitorem tego transportera, co również może tłumaczyć jej skuteczne profilaktyczne działanie w CIPN [407].

Dotychczas, nie są znane biomarkery umożliwiające ocenę i diagnozowanie CIPN, jak również możliwość szacowania podatności oraz intensywności nasilenia objawów neuropatii w oparciu o rodzaj zastosowanego leku przeciwnowotworowego, dawkę, czas ekspozycji oraz czynniki współwystępujące [243,408]. Badania zgłębiające mechanizmy odpowiedzialne za rozwój CIPN być może w przyszłości umożliwią opracowanie skuteczniejszych metod profilaktycznych.

5.7.2 Profilaktyczne podanie ambroksolu i bromheksyny

W niniejszej pracy zweryfikowano również skuteczność podania profilaktycznego ambroksolu i bromheksyny u myszy poddanych działaniu oksaliplatyny. Wykorzystano, tak jak we wcześniejszym badaniu, dwa schematy podania profilaktycznego: podanie jednorazowe oraz wielokrotne. Oba leki zostały podane w tych samych dawkach (90 i 150 mg/kg) dootrzewnowo, a działanie ochronne oceniono w teście zimnej płytki i teście von Freya.

W teście zimnej płytki jednorazowe podanie profilaktyczne ambroksolu i bromheksyny nie wykazało istotnego wpływu na nadwrażliwość termiczną w pierwszym dniu eksperymentu (ambroksol: Rozdział 4.2.6.3, Rycina 23A; bromheksyna: Rozdział 4.2.7.2, Rycina 26A). Ambroksol podany w dawkach 90 i 150 mg/kg jednorazowo przed oksaliplatyną w pierwszym

dniu eksperymentu istotnie statystycznie opóźniał czas wystąpienia reakcji bólowej w odpowiedzi na działający bodziec termiczny u zwierząt po siedmiu dniach od podania cytostatyka (Rozdział 4.2.6.3, Rycina 23A). W przypadku bromheksyny nie zaobserwowano takiej aktywności.

W teście von Freya w schemacie profilaktyki jednorazowej działanie ochronne, hamujące rozwój nadwrażliwości mechanicznej w pierwszym dniu po podaniu oksaliplatyny wykazała bromheksyna podana w najwyższej dawce 150 mg/kg. Dodatkowo wysoka dawka bromheksyny podana jednorazowo przed podaniem cytostatyka hamowała rozwój nadwrażliwości mechanicznej w siódmym dniu eksperymentu (Rozdział 4.2.7.2, Rycina 26B). Z kolei ambroksol nie wykazał wpływu na nadwrażliwość mechaniczną w pierwszym dniu po podaniu oksaliplatyny, ale podany w dawce 150 mg/kg hamował rozwój nadwrażliwości mechanicznej po siedmiu dniach od podania cytostatyka znacząco podwyższając wartości pomiarów otrzymanych w teście von Freya (Rozdział 4.2.6.3, Rycina 23B). Ambroksol i bromheksyna podawane wielokrotnie przed oksaliplatyną wykazały tendencję hamowania rozwoju nadwrażliwości mechanicznej (ambroksol: Rozdział 4.2.6.3, Rycina 24B; bromheksyna: Rozdział 4.2.7.2, Rycina 27B).

W teście zimnej płytki oraz teście von Freya skuteczność hamującą rozwój CIPN wykazał ambroksol, przy czym w celu osiągnięcia takiego efektu wystarczające było jednorazowe podanie profilaktyczne tego leku. W obu przypadkach zastosowana terapia profilaktyczna wpływała na rozwój nadwrażliwości pod siedmiu dniach od podania oksaliplatyny, co biorąc pod uwagę mechanizm działania ambroksolu i bromheksyny jest zjawiskiem ciekawym i wartym zgłębienia.

Badania ostatnich lat potwierdzają działanie neuroprotektoryjne ambroksolu, które może wynikać z pobudzenie aktywności glukocerebrozydazy (GCazy), której obniżona aktywność występuje w takich schorzeniach, jak choroba Parkinsona [409], stwardnienie zanikowe boczne oraz choroba Gauchera [410]. Wydaje się możliwe, iż ujawnione działanie neuroprotektoryjne ambroksolu może wynikać ze zdolności do modyfikowania gangliozydów krytycznych dla procesów neurotroficznych/neuroprotektoryjnych w organizmie [410]. Jednak w celu potwierdzenia tych doniesień niezbędne są dalsze badania.

Właściwości neuroprotektoryjne ambroksolu mogą odpowiadać za wykazane w niniejszym badaniu działanie profilaktyczne w modelu CIPN. Jednocześnie, należy pamiętać, iż oznaczony efekt ochronny mógł zostać osiągnięty poprzez udział innych mechanizmów w wykazanym dla ambroksolu działaniu. Efekt ten jest ważny, ponieważ dotyczy zarówno nadwrażliwości termicznej i mechanicznej.

W przypadku bromheksyny domniemany mechanizm działania profilaktycznego jest nieznany. Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki, można założyć, iż nie wynika on z działania metabolitu – ambroksolu. Może on być wypadkową skuteczności samej bromheksyny albo innego niż ambroksol metabolitu. Należy też rozważyć antagonistyczne działanie bromheksyny na receptory sigma-1, jako możliwy mechanizm działania profilaktycznego tego leku. Antagoniści receptora sigma-1, jak np. związek MR309, ujawniają silne działanie neuroprotektoryjne. Związek MR309 podawany pacjentom onkologicznym przyjmującym oksaliplatynę wykazał skuteczność w łagodzeniu ostrej fazy CIPN oraz dodatkowo zmniejszył odsetek pacjentów, u których rozwijała się ciężka przewlekła forma CIPN [411]. Ponadto,

poprzez oddziaływanie z receptorami sigma-1 występuje możliwość modulowania kanałów jonowych (m.in. sodowych, wapniowych, potasowych, TRP), które jak wiadomo odgrywają istotną rolę w patofizjologii bólu [412].

5.8 PORÓWNANIE SKUTECZNOŚCI DULOKSETYNY I PREGABALINY W TEŚCIE PREFERENCJI MIEJSCA

Badania *in vivo* stanowią niezbędny i konieczny etap badań przedklinicznych w poszukiwaniu skutecznego leczenia przeciwbólowego [413,414]. Nadwrażliwość na niską temperaturę u pacjentów leczonych oksalipłatyną jest dominującym działaniem niepożądanym, występującym u około 81–98% pacjentów [415]. Stąd też poszukiwanie skutecznego leczenia zwiększonej wrażliwości na niską temperaturę wydaje się kluczowe w celu poprawy jakości życia chorych.

W przypadku testu zimnej płytki, obserwacja reakcji bólowych jest niezwykle subiektywna i w dużym stopniu zależy od doświadczenia badacza, wrażliwości termicznej zwierząt oraz otoczenia wpływającego na zachowania behawioralne zwierząt [416].

Biorąc pod uwagę te trudności w ramach ostatniego etapu badań wykorzystano nowy sprzęt, zaprojektowany i skonstruowany na potrzeby projektu w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki, umożliwiający pomiar preferencji temperaturowych zwierząt, dzięki dwóm niezależnym płytkom, których temperatura może być w dowolny sposób regulowana przez eksperymentatora. Dodatkowo zwierzęta umieszczane w aparaturze mają możliwość swobodnego przemieszczania się pomiędzy obiema płytkami, a czas spędzany w poszczególnych strefach termicznych jest rejestrowany za pomocą kamery i analizowany z wykorzystaniem matematyczno-komputerowych metod analizy obrazu (Rozdział 4.5, Rycina 50).

Dzięki zastosowanej rejestracji wizualnej przeprowadzanych eksperymentów oraz analizy komputerowej uzyskanych wyników, wyeliminowano wpływ eksperymentatora na jakość i wiarygodność otrzymanych wyników. Co więcej, zaprojektowany sprzęt umożliwia: pomiar bólu wywołanego wyłącznie bodźcem termicznym, wysoce precyzyjną kontrolę regulacji zastosowanej temperatury poszczególnych płytek, dowolność w ustawieniach temperatury poszczególnych płytek, a pomiary uzyskiwane są dla swobodnie poruszających się zwierząt, co łagodzi stres i osłabia reakcje związane z tzw. analgezią wywołaną stresem. Eksperymenty skoncentrowane na badaniu behawioralnych reakcji termoregulacyjnych zwierząt wykazały, że myszy zdrowe, bez neuropatii na ogół preferują temperaturę otoczenia 22–30 °C, natomiast temperatury przekraczające 34 °C u tych zwierząt wywołują stres cieplny [417].

W ramach eksperymentu oceniono preferencje temperaturowe zwierząt po podaniu dwóch leków, które obecnie uważane są za najskuteczniejsze i modelowe w łagodzeniu objawów bólu neuropatycznego w przebiegu CIPN – pregabaliny i duloksetyny. Obydwa leki podano w dawce 30 mg/kg, która była dawką aktywną we wcześniejszych etapach badań. Pomiar przeprowadzany był w dziewięciu wariantach temperaturowych w zakresie temperatur od 0 °C do 45 °C, w których każdorazowo różnica pomiędzy płytkami wynosiła 5°C (Rozdział 4.5, Rycina 51).

Otrzymane wyniki okazały się bardzo interesujące. We wszystkich grupach zwierząt zaobserwowano brak różnic w preferencji temperaturowej w przypadku pomiaru wykonanego przed podaniem oksaliplatyny i przed podaniem badanego leku (pomiar po podaniu oksaliplatyny). Oznacza to, że podanie cytostatyka nie wpływało na preferencje temperaturowe zwierząt. Obydwa leki (duloksetyna i pregabalina) podobnie wpływały na wrażliwość termiczną myszy w temperaturach powyżej temperatury preferowanej fizjologicznie przez zwierzęta. Zarówno w przypadku gryzoni otrzymujących duloksetynę i pregabalinę, w temperaturach powyżej 30 °C zwierzęta preferowały temperatury niższe. Oznacza to, iż proponowany model i metoda może służyć również do oceny wpływu związków w zakresie temperatur preferowanych oraz drażniących. Oznaczając preferencje zwierząt w wyższych temperaturach można określić, czy badane leki nie wykazują działania niepożądanego wynikającego z nadmiernego obniżania wrażliwości bólowej gryzoni, również w wysokich temperaturach (utrata fizjologicznych odruchów ochronnych – „reakcje ucieczki” ze strefy o zbyt wysokiej temperaturze).

W przypadku niższych temperatur, czyli głównie poniżej zakresu temperatur preferowanych przez zwierzęta duloksetyna wykazywała działanie przeciwbólowe, polegające na odwróceniu lub zniesieniu preferencji w kierunku temperatur wyższych. W przypadku temperatur optymalnych dla zwierząt zdrowych, duloksetyna nie wykazywała takiego działania. Pregabalina nie była selektywna dla temperatur poniżej preferowanego przez zwierzęta zakresu termicznego i wpływała na odczuwanie bólu w znacznie szerszym zakresie stosowanych temperatur. Oznacza to, iż duloksetyna w modelu CIPN lepiej radzi sobie z kontrolą bólu wykazując działanie preferencyjnie w niższych temperaturach, co jest efektem pożądanym w przypadku leczenia bólu będącego powikłaniem stosowania oksaliplatyny, której głównym działaniem niepożądanym jest wywoływanie nadwrażliwości na niską temperaturę.

Zaprezentowany model pomiaru preferencji temperaturowej zwierząt stanowi nową, ulepszoną metodę oceny skuteczności analgetycznej związków w szerokim zakresie temperatur. Oprócz zalet wynikających z samej konstrukcji aparatury oraz użytych rozwiązań matematyczno-komputerowych, zaproponowana metoda umożliwia ocenę zarówno skuteczności terapeutycznej związków, jak również ich potencjalnego działania niepożądanego, zdolności do wywołania hipotalgezji, hiperalgezji oraz zaburzeń czucia w zakresie różnych temperatur.

Należy pamiętać, iż zaproponowane podejście ma również pewne ograniczenia wynikające z innowacyjności proponowanej metody oraz braku podobnych badań umożliwiających pełną interpretację otrzymanych wyników, oraz wyjaśnienie zaobserwowanych zjawisk. Metoda ta może być ciekawą opcją służącą do badania preferencji temperaturowych w innych modelach bólu neuropatycznego, takich jak CIPN indukowana innymi cytostatykami: paklitakselem, winkrystyną, czy bortezomibem; polineuropatia cukrzycowa oraz modele uszkodzenia mechanicznego nerwów.

5.9 OGRANICZENIA PRZEPROWADZONYCH BADAŃ

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przebadano wybrane leki i związki chemiczne, których mechanizmy działania mogą być zaangażowane w zjawisko analgezji w przebiegu CIPN. W celu oceny skuteczności przeciwbólowej tych związków zastosowano zwierzęcy model CIPN indukowanej pojedynczym podaniem oksaliplatyny. Otrzymane wyniki poszerzają dostępną wiedzę na temat leczenia i profilaktyki tego powikłania polekowego. Jednak w tym miejscu należy podkreślić, iż otrzymane wyniki są rezultatem badań na zwierzętach, co niesie pewne ograniczenia w przypadku chęci ich translacji na ludzi. Problem translacji badań na zwierzętach jest powszechnym zjawiskiem, związanym z możliwym brakiem skuteczności terapii u pacjentów [9,418–420].

W niniejszej pracy wykorzystano model pojedynczego podania oksaliplatyny, który w warunkach laboratoryjnych u gryzoni prowadził do indukcji nadwrażliwości termicznej i mechanicznej jako objawów CIPN. W przypadku pacjentów przyjmujących terapię przeciwnowotworową oksaliplatyna podawana jest w podzielonych dawkach przez określony czas, co może istotnie rzutować na odmienny zakres zmian związanych z rozwojem CIPN oraz skuteczność analgetyczną zastosowanej terapii.

Na skuteczność farmakologiczną zastosowanego leczenia przeciwbólowego u ludzi mają wpływ takie czynniki płęć, genotyp, wiek, choroby współistniejące, różnice neurofizjologiczne, czy nawet styl życia i poziom socjoekonomiczny [421–425]. Część tych czynników jest również ważna w przypadku badań na zwierzętach. W niniejszej pracy do badań behawioralnych wykorzystano wyłącznie samce myszy CD-1. Jak wiadomo skuteczność analgetyczna leków u samców i samic myszy może być różna [126,132,426,427]. Stąd też, w celu osiągnięcia pełnego obrazu skuteczności przeciwbólowej badanych substancji należałoby poszerzyć badania o samice myszy. Dodatkowym czynnikiem, który należałoby uwzględnić jest ocena skuteczności terapii przeciwbólowej u pacjentów w różnym wieku. Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej wykonywano na zbliżonej wiekowo grupie zwierząt (wiek ok. 4–6 tygodni), podczas gdy u pacjentów mogą występować duże rozbieżności w zakresie wieku, co może determinować odpowiedź na leczenie.

W przypadku pacjentów cierpiących z powodu CIPN, terapia przeciwnowotworowa stosowana jest w związku ze zmianą nowotworową, która w znaczny sposób może wpływać na funkcje życiowe i stan pacjentów, jak i odpowiedź na leki, w tym leki przeciwbólowe. W zastosowanym modelu zwierzęcym wykorzystywano zwierzęta, bez zmian nowotworowych, co potencjalnie może być przyczyną odmiennej odpowiedzi na badane leki/związki chemiczne u tych zwierząt w porównaniu z badaniami klinicznymi.

W kontekście translacyjności przeprowadzonych badań, należy też wziąć pod uwagę ograniczenia związane z wykorzystaniem zwierzęcego modelu – w tym z problemem komunikowania objawów bólowych i sygnalizowania stopnia ich natężenia.

Ponadto, w ramach niniejszej pracy skupiono się na behawioralnych oznakach bólu neuropatycznego jako objawu niepożądanego terapii onkologicznej oraz skuteczności analgetycznej wybranych leków i związków. Nie zbadano, czy badane związki wpływają na neurofizjologiczne i neuromorfologiczne aspekty CIPN oraz nie zbadano całego spektrum interakcji lek–lek, jakie mogą wystąpić podczas terapii skojarzonej [420].

Podsumowując, niniejsza praca doktorska pozwala wyselekcjonować leki i związki chemiczne o potencjalnej skuteczności w łagodzeniu objawów oraz wykazujące działanie profilaktyczne – hamujące rozwój objawów bólowych CIPN u myszy. Ponieważ schorzenie to dotyka coraz większej liczby pacjentów, a podłoże i występujące objawy są częściowo zbliżone u gryzoni i ludzi, badania przedkliniczne są istotnym źródłem informacji i wstępem do badań klinicznych. W przypadku większości związków udało się wyznaczyć dawkę efektywną i podprogową zarówno w teście zimnej płytki, jak i teście von Freya. Dodatkowo zastosowanie schematów podania skojarzonego z odstępem czasowym wskazało na interesujący profil działania analgetycznego niektórych połączeń (np. podanie skojarzone pregabaliny i ambroksolu). Ponadto w przypadku podania wielokrotnego leków wykazano działanie ochronne – hamujące rozwój nadwrażliwości późnej (wielokrotne podanie simwastatyny, duloksetyny, ambroksolu, bromheksyny, ceftriaksonu, minocykliny oraz wielokrotne podanie skojarzone minocykliny i duloksetyny).

Zastosowanie schematu podania profilaktycznego umożliwiło ocenę potencjalnego działania ochronnego leków w rozwój modelu CIPN. Szczególną uwagę należy zwrócić na duloksetynę, dla której wykazano taką aktywność już po podaniu jednorazowym oraz ambroksol, który podany jednorazowo, hamował rozwój nadwrażliwości na bodźce termiczne i mechaniczne u myszy poddanych działaniu oksaliplatyny.

Zastosowanie w ostatnim etapie badań nowej aparatury eksperymentalnej umożliwiło ocenę preferencji temperaturowych zwierząt w zależności od zastosowanej temperatury płytek oraz podanych leków. Innowacyjne podejście i wykorzystanie metod komputerowych usprawniło pozyskiwanie i interpretację wyników. Ten ostatni etap badań pozwolił dokładniej ocenić aktywność farmakologiczną duloksetyny i pregabaliny w zakresie ich działania przeciwbólowego w zwierzęcym modelu CIPN indukowanej oksaliplatyną.

6 WNIOSKI

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że:

- I. Jednorazowe podanie oksaliplatyny powodowało wystąpienie objawów bólowych charakterystycznych dla CIPN. Objawy nadwrażliwości termicznej i mechanicznej występowały już po 3 h od podania cytostatyka i utrzymywały się co najmniej do tygodnia po jego jednorazowym podaniu.
- II. Duloksetyna (10 i 30 mg/kg *i.p.*) wykazała istotny wpływ na objawy CIPN, w szczególności w schemacie podania profilaktycznego.
- III. Pregabalina (30 mg/kg *i.p.*), amitryptylina (2.5 i 10 mg/kg *i.p.*), cebranopadol (10 mg/kg *s.c.*) łagodziły objawy nadwrażliwości termicznej.
- IV. Ambroksol wykazał skuteczność w teście zimnej płytki po podaniu dożylnym (37.5 mg/kg *i.v.*), a zastosowanie wyższych dawek tego leku podawanego drogą dootrzewnową okazało się skuteczne wyłącznie w teście von Freya.
- V. Profilaktyczne jednorazowe podanie ambroksolu (90 i 150 mg/kg *i.p.*) wykazało działanie hamujące rozwój nadwrażliwości termicznej i mechanicznej.
- VI. Bromheksyna (90 i 150 mg/kg *i.p.*) wykazała znamienne skutecznosc w łagodzeniu objawów nadwrażliwości mechanicznej, a podana wielokrotnie (150 mg/kg) hamowała rozwój nadwrażliwości termicznej i mechanicznej.
- VII. Jednorazowe profilaktyczne podanie bromheksyny (150 mg/kg *i.p.*) hamowało rozwój nadwrażliwości mechanicznej po podaniu oksaliplatyny.
- VIII. Aripiprazol (1 i 10 mg/kg *i.p.*) i ceftriakson (50 i 200 mg/kg *i.p.*) wykazały silny efekt przeciwbólowy, łagodzący objawy nadwrażliwości mechanicznej; aktywność przeciwbólowa aripiprazolu w teście zimnej płytki była prawdopodobnie wynikiem fałszywie pozytywnym.
- IX. Befiradol (2.5 i 5 mg/kg *i.p.*) łagodził objawy nadwrażliwości mechanicznej.
- X. Simwastatyna (100 mg/kg *p.o.*) wykazała aktywność po podaniu wielokrotnym, hamując rozwój nadwrażliwości termicznej i utrzymywała takie działanie nawet do dwóch tygodni po podaniu cytostatyka.

- XI. Wielokrotnie podana minocyklina (100 mg/kg *i.p.*) wykazała działanie ochronne na rozwój nadwrażliwości termicznej i mechanicznej, natomiast podana jednorazowo (50 i 100 mg/kg *i.p.*) była aktywna wyłącznie w teście von Freya.

W schemacie podania skojarzonego:

- XII. Podanie duloksetyny (30 mg/kg *i.p.*) i ambroksolu (90 mg/kg *i.p.*) wykazało działanie toksyczne.
- XIII. Połączenie pregabaliny (10 mg/kg *i.p.*) i ambroksolu (12.5 mg/kg *i.v.*) istotnie łagodziło objawy nadwrażliwości termicznej.
- XIV. Połączenie lakoamidu (10 i 30 mg/kg *i.p.*) w skojarzeniu z ambroksolem (90 mg/kg *i.p.*) lub pregabaliną (10 i 30 mg/kg *i.p.*) wykazało silny efekt przeciwbólowy w teście von Freya.
- XV. Wielokrotne i jednorazowe podania skojarzone aripirazolu (1 i 10 mg/kg *i.p.*) i ceftriaksonu (50 i 200 mg/kg *i.p.*) łagodziły objawy nadwrażliwości mechanicznej u myszy poddanych działaniu oksaliplatyny.
- XVI. Połączenie minocykliny (50 i 100 mg/kg *i.p.*) i duloksetyny (10 mg/kg *i.p.*) łagodziło objawy nadwrażliwości mechanicznej, ale nie termicznej w modelu CIPN oraz hamowało rozwój nadwrażliwości termicznej i mechanicznej w schemacie podania wielokrotnego.
- XVII. Podanie skojarzone minocykliny (50 i 100 mg/kg *i.p.*) i ambroksolu (90 mg/kg *i.p.*) jednorazowe i wielokrotne wykazało działanie przeciwbólowe wyłącznie w teście von Freya.

Dodatkowo:

- XVIII. Wykorzystanie nowej aparatury pomiarowej umożliwiło oznaczenie preferencji temperaturowych zwierząt oraz wykazało przewagę duloksetyny nad pregabaliną w łagodzeniu objawów nadwrażliwości termicznej u zwierząt otrzymujących oksaliplatynę.

7 SPIS PUBLIKACJI OBJĘTYCH ROZPRAWĄ DOKTORSKĄ

1. Sałat, K., **Furgała-Wojas, A.**, & Sałat, R. (2021). The microglial activation inhibitor minocycline, used alone and in combination with duloxetine, attenuates pain caused by oxaliplatin in mice. *Molecules*, 26(12), 3577.
2. Sałat, K., **Furgała-Wojas, A.**, Awtoniuk, M., & Sałat, R. (2021). Wide-Range Measurement of Thermal Preference—A Novel Method for Detecting Analgesics Reducing Thermally-Evoked Pain in Mice. *Molecules*, 26(3), 612.
3. **Furgała-Wojas, A.**, Kowalska, M., Nowaczyk, A., Fijałkowski, Ł., & Sałat, K. (2020). Comparison of bromhexine and its active metabolite-ambroxol as potential analgesics reducing oxaliplatin-induced neuropathic pain-pharmacodynamic and molecular docking studies. *Current Drug Metabolism*, 21(7), 548-561.
4. Sałat, K., **Furgała, A.**, & Sałat, R. (2019). Interventional and preventive effects of aripiprazole and ceftriaxone used alone or in combination on oxaliplatin-induced tactile and cold allodynia in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 882-890.
5. **Furgała, A.**, Sałat, R., & Sałat, K. (2018). Acute cold allodynia induced by oxaliplatin is attenuated by amitriptyline. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 78, 315-321.
6. **Furgała, A.**, Fijałkowski, Ł., Nowaczyk, A., Sałat, R., & Sałat, K. (2018). Time-shifted co-administration of sub-analgesic doses of ambroxol and pregabalin attenuates oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 930-940.
7. Sałat, K., **Furgała, A.**, & Sałat, R. (2018). Evaluation of cebranopadol, a dually acting nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor agonist in mouse models of acute, tonic, and chemotherapy-induced neuropathic pain. *Inflammopharmacology*, 26(2), 361-374.
8. Sałat, K., Kołaczkowski, M., **Furgała, A.**, Rojek, A., Śniecikowska, J., Varney, M. A., & Newman-Tancredi, A. (2017). Antinociceptive, antiallodynic and antihyperalgesic effects of the 5-HT_{1A} receptor selective agonist, NLX-112 in mouse models of pain. *Neuropharmacology*, 125, 181-188.

8 STRESZCZENIE

Neuropatia obwodowa indukowana chemioterapią (ang. *chemotherapy-induced peripheral neuropathy*, CIPN) jest powszechnym działaniem niepożądanym, które występuje u ponad 60% pacjentów przyjmujących chemioterapię różnymi lekami przeciwnowotworowymi, w tym m.in. oksaliplatyną. Terapia łagodząca objawy CIPN jest mało skuteczna i problematyczna.

Celem niniejszej pracy była ocena skuteczności analgetycznej leków i wybranych nowych związków chemicznych w zwierzęcym modelu CIPN. Chcąc osiągnąć wyższą skuteczność analgetyczną tych substancji wykorzystano różne schematy podania, w tym: podanie jednorazowe, wielokrotne oraz skojarzone. Ponadto oceniono działanie profilaktyczne niektórych leków w modelu CIPN, a wykorzystując nową aparaturę badawczą oznaczono preferencje temperaturowe zwierząt przed i po podaniu oksaliplatyny i dwóch leków stosowanych w farmakoterapii CIPN.

W pracy udowodniono, iż w celu indukcji modelu CIPN z użyciem oksaliplatyny wystarczające jest jednorazowe podanie tego leku w dawce 10 mg/kg, które wywołuje zauważalne zmiany behawioralne zwierząt w teście zimnej płytki i teście von Freya, a zmiany te obserwowane są w pierwszym i siódmym dniu po podaniu cytostatyka.

Wykazano, że leki takie jak: duloksetyna (30 mg/kg), pregabalina (30 mg/kg), amitryptylina (2.5 i 10 mg/kg), cebranopadol (10 mg/kg), lakoamid (30 mg/kg) oraz ambroksol (37.5 mg/kg, *i.v.*) łagodzą objawy nadwrażliwości termicznej i ujawniają działanie przeciwbólowe w teście zimnej płytki. Skuteczność w łagodzeniu objawów nadwrażliwości mechanicznej została oznaczona dla wszystkich przebadanych w niniejszej pracy leków i związków chemicznych. Co więcej, po podaniu niektórych leków zauważono efekt hamujący rozwój nadwrażliwości po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny. Efekt ten w teście zimnej płytki uzyskano dla wielokrotnie podanej: duloksetyny (30 mg/kg), bromheksyny (150 mg/kg), simwastatyny (100 mg/kg) oraz minocykliny (100 mg/kg), natomiast w teście von Freya taką aktywność wykazano dla: duloksetyny (10 i 30 mg/kg) po podaniu jednorazowym i wielokrotnym, jak również ambroksolu (90 i 150 mg/kg), bromheksyny (90 i 150 mg/kg), ceftriaksonu (200 mg/kg) oraz minocykliny (50 i 100 mg/kg) po podaniu wielokrotnym.

Zastosowanie schematu podania skojarzonego umożliwiło oznaczenie działania przeciwbólowego, łagodzącego objawy nadwrażliwości termicznej, w przypadku podania połączenia pregabaliny (10 mg/kg) i ambroksolu (37.5 mg/kg). W łagodzeniu objawów nadwrażliwości mechanicznej skuteczność analgetyczną wykazały wszystkie zastosowane skojarzone podania leków. Dodatkowo, wielokrotne podanie minocykliny (50 mg/kg) i duloksetyny (10 mg/kg) hamowało rozwój nadwrażliwości termicznej, natomiast wielokrotne podanie połączeń: aripiprazolu (10 mg/kg) i ceftriaksonu (50 mg/kg), minocykliny (50 mg/kg) i duloksetyny (10 mg/kg) oraz minocykliny (50 mg/kg) i ambroksolu (90 mg/kg) hamowało rozwój nadwrażliwości mechanicznej po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny.

Ocena profilu ochronnego duloksetyny, ambroksolu i bromheksyny w schemacie podania profilaktycznego potwierdziła zasadność zastosowania duloksetyny (10 i 30 mg/kg) jako profilaktyki rozwoju objawów CIPN podczas terapii oksaliplatyną. W przypadku podania ambroksolu i bromheksyny badanie pozwoliło wykazać potencjał ochronny, hamujący rozwój nadwrażliwości termicznej i mechanicznej po jednorazowym podaniu ambroksolu

(90 i 150 mg/kg) oraz nadwrażliwości mechanicznej po jednorazowym podaniu bromheksyny (150 mg/kg) w zwierzęcym modelu CIPN indukowanej podaniem oksaliplatin.

Zastosowanie w ostatnim etapie badań nowej aparatury eksperymentalnej umożliwiło ocenę preferencji temperaturowych zwierząt w zależności od zastosowanej temperatury płytek oraz podanych leków. Innowacyjne podejście i wykorzystanie metod komputerowych usprawniło pozyskiwanie i interpretację wyników. Ten etap badań pozwolił dokładniej ocenić aktywność farmakologiczną duloksetyny i pregabaliny w zakresie ich działania przeciwbólowego w zwierzęcym modelu CIPN.

Podsumowując, niniejsza praca doktorska pozwoliła wyselekcjonować leki i związki chemiczne o potencjalnej skuteczności w łagodzeniu objawów CIPN oraz wykazujące działanie profilaktyczne - hamujące rozwój objawów bólowych CIPN u myszy. Ponieważ powikłanie to dotyka coraz większą liczbę pacjentów, a etiopatogeneza i występujące objawy są częściowo zbliżone u gryzoni i ludzi, badania przedkliniczne mogą być istotnym źródłem informacji i wstępem do ewentualnych badań klinicznych.

9 ABSTRACT

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is a common side effect that occurs in more than 60% of patients receiving chemotherapy with various anticancer drugs, including oxaliplatin. The therapy to alleviate the symptoms of CIPN is generally ineffective and problematic.

The aim of this doctoral dissertation was to evaluate the analgesic efficacy of drugs and selected new chemical compounds in the animal CIPN model. To maximize the analgesic efficacy of these substances, various administration schedules were used, including single, multiple, and combined administration. In addition, the prophylactic effect of some drugs was assessed in the CIPN model, and the temperature preferences of animals before and after the administration of oxaliplatin and two drugs used in CIPN pharmacotherapy were determined with the use of new research equipment.

The study proved that to induce the CIPN model with oxaliplatin, a single administration of this drug at a dose of 10 mg/kg is sufficient, which causes noticeable behavioral changes in animals in the cold plate test and the von Frey test, and these changes are observed in the first and seventh day after administration of the cytostatic.

Drugs, such as duloxetine (30 mg/kg), pregabalin (30 mg/kg), amitriptyline (2.5 and 10 mg/kg), cebranopadol (10 mg/kg), lacosamide (30 mg/kg) and ambroxol (37.5 mg/kg, *i.v.*) have shown to alleviate the symptoms of thermal hypersensitivity and reveal an analgesic effect in the cold plate test. The effectiveness in moderating symptoms of mechanical hypersensitivity was determined for all drugs and chemical compounds tested in this study. In addition, after administration of some drugs, an inhibitory effect on the development of hypersensitivity was noted 7 days after the administration of oxaliplatin. This effect was determined in the cold plate test for multiple dosing: duloxetine (30 mg/kg), bromhexine (150 mg/kg), simvastatin (100 mg/kg) and minocycline (100 mg/kg), while in the von Frey test this activity has been demonstrated for: duloxetine (10 and 30 mg/kg) after single and multiple dosing, ambroxol (90 and 150 mg/kg) after multiple dosing, bromhexine (90 and 150 mg/kg) after multiple dosing, ceftriaxone (200 mg/kg) after multiple dosing and minocycline (50 and 100 mg/kg) after multiple dosing.

The use of the combination drug protocol made it possible to determine the analgesic effect in the relief of symptoms of thermal hypersensitivity in the case of administration of the combination of pregabalin (10 mg/kg) and ambroxol (37.5 mg/kg), while the analgesic efficacy symptoms of mechanical hypersensitivity was demonstrated by all the combined drug administrations. Additionally, repeated administration of minocycline (50 mg/kg) and duloxetine (10 mg/kg) inhibited the development of thermal hypersensitivity, while repeated administration of the combination of aripiprazole (10 mg/kg) and ceftriaxone (50 mg/kg), minocycline (50 mg/kg) and duloxetine (10 mg/kg) and minocycline (50 mg / kg) and ambroxol (90 mg/kg) inhibited the development of mechanical hypersensitivity 7 days after administration of oxaliplatin.

The assessment of the protective profile of duloxetine, ambroxol and bromhexine in the prevention protocol confirmed the use of duloxetine (10 and 30 mg/kg) as a prophylaxis of the development of CIPN symptoms during oxaliplatin therapy. Ambroxol and bromhexine,

demonstrated the protective potential, inhibiting the development of thermal and mechanical hypersensitivity after a single administration of ambroxol (90 and 150 mg/kg) and mechanical hypersensitivity after a single administration of bromhexine (150 mg/kg) in an animal model of CIPN induced by oxaliplatin.

The use of new experimental equipment, in the last part of the research, made it possible to evaluate the thermal preferences of animals depending on the plates temperature and administered drugs. The innovative approach and the use of computer methods have improved the acquisition and interpretation of results. This last step of the study allowed a more accurate assessment of the pharmacological activity of duloxetine and pregabalin in terms of their analgesic effect in an animal model of CIPN.

In conclusion, this doctoral dissertation allows to select drugs and chemical compounds with potential efficacy in alleviating symptoms and showing a preventive effect - inhibiting the development of CIPN pain symptoms in mice. Because this drug complication affects an increasing number of patients, and the etiopathogenesis and symptoms are partially similar in rodents and humans, preclinical studies may be an important source of information and introduction for clinical trials.

10 BIBLIOGRAFIA

- [1] Jensen TS, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, Rice ASC, et al. A new definition of neuropathic pain. *Pain* 2011;152:2204–5. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.06.017>.
- [2] Treede RD, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, et al. Chronic pain as a symptom or a disease: The IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain* 2019. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001384>.
- [3] Scholz J, Finnerup NB, Attal N, Aziz Q, Baron R, Bennett MI, et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic neuropathic pain. *Pain* 2019. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001365>.
- [4] Bannister K, Sachau J, Baron R, Dickenson AH. Neuropathic Pain: Mechanism-Based Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2020;60:257–74. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021524>.
- [5] Yusi He, Peggy Kim. Allodynia Article - StatPearls n.d. https://www.statpearls.com/kb/viewarticle/17379?utm_source=pubmed&utm_campaign=freequestions&utm_content=17379 (accessed October 5, 2020).
- [6] Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *The Lancet Neurology* 2014;13:924–35. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70102-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70102-4).
- [7] MacFarlane B V., Wright A, O’Callaghan J, Benson HAE. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. *Pharmacology and Therapeutics* 1997. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(97\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(97)00019-3).
- [8] Taiwe GS, Kuete V. Management of Inflammatory and Nociceptive Disorders in Africa. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, Elsevier; 2017, p. 73–92. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00002-9>.
- [9] Sałat K. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: part 1—current state of knowledge and perspectives for pharmacotherapy. *Pharmacological Reports* 2020. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00109-y>.
- [10] Colvin LA. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Where are we now? *Pain* 2019;160:S1–10. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001540>.
- [11] Zajackowska R, Kocot-Kępska M, Leppert W, Wrzosek A, Mika J, Wordliczek J. Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *International Journal of Molecular Sciences* 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20061451>.
- [12] Flatters SJL, Dougherty PM, Colvin LA. Clinical and preclinical perspectives on Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN): a narrative review. *British Journal of Anaesthesia* 2017;119:737–49. <https://doi.org/10.1093/bja/aex229>.
- [13] Staff NP, Grisold A, Grisold W, Windebank AJ. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review. *Annals of Neurology* 2017;81:772–81. <https://doi.org/10.1002/ana.24951>.
- [14] Chan A, Hertz DL, Morales M, Adams EJ, Gordon S, Tan CJ, et al. Biological predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): MASCC neurological complications working group overview. *Supportive Care in Cancer* 2019;27:3729–37. <https://doi.org/10.1007/s00520-019-04987-8>.
- [15] Marmioli P, Scuteri A, Cornblath DR, Cavaletti G. Pain in chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2017. <https://doi.org/10.1111/jns.12226>.
- [16] Starobova H, Vetter I. Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Front Mol Neurosci* 2017;10:174. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00174>.
- [17] Wolf S, Barton D, Kottschade L, Grothey A, Loprinzi C. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Prevention and treatment strategies. *European Journal of Cancer* 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.04.018>.
- [18] Ma J, Kavelaars A, Dougherty PM, Heijnen CJ. Beyond symptomatic relief for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Targeting the source. *Cancer* 2018;124:2289–98. <https://doi.org/10.1002/cncr.31248>.
- [19] Kerckhove N, Collin A, Condé S, Chaletex C, Pezet D, Balayssac D. Long-Term Effects, Pathophysiological Mechanisms, and Risk Factors of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathies: A Comprehensive Literature Review. *Frontiers in Pharmacology* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00086>.
- [20] Molassiotis A, Cheng HL, Leung KT, Li YC, Wong KH, Au JSK, et al. Risk factors for chemotherapy-induced peripheral neuropathy in patients receiving taxane- and platinum-based chemotherapy. *Brain and Behavior* 2019:e01312. <https://doi.org/10.1002/brb3.1312>.

- [21] Bao T, Basal C, Seluzicki C, Li SQ, Seidman AD, Mao JJ. Long-term chemotherapy-induced peripheral neuropathy among breast cancer survivors: prevalence, risk factors, and fall risk. *Breast Cancer Research and Treatment* 2016. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3939-0>.
- [22] Duggett NA, Griffiths LA, McKenna OE, de Santis V, Yongsanguanchai N, Mokori EB, et al. Oxidative stress in the development, maintenance and resolution of paclitaxel-induced painful neuropathy. *Neuroscience* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.050>.
- [23] Yang Y, Zhao B, Gao X, Sun J, Ye J, Li J, et al. Targeting strategies for oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: clinical syndrome, molecular basis, and drug development. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2021;40:1–25. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02141-z>.
- [24] Kang L, Tian Y, Xu S, Chen H. Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: clinical features, mechanisms, prevention and treatment. *Journal of Neurology* 2021. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-09942-w>.
- [25] Ludman T, Melemedjian OK. Bortezomib-induced aerobic glycolysis contributes to chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy. *Molecular Pain* 2019;15:174480691983742. <https://doi.org/10.1177/1744806919837429>.
- [26] Zheng H, Xiao WH, Bennett GJ. Mitotoxicity and bortezomib-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Experimental Neurology* 2012. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.08.023>.
- [27] Fukuda Y, Li Y, Segal RA. A Mechanistic Understanding of Axon Degeneration in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Frontiers in Neuroscience* 2017;11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00481>.
- [28] Staff NP, Podratz JL, Grassner L, Bader M, Paz J, Knight AM, et al. Bortezomib alters microtubule polymerization and axonal transport in rat dorsal root ganglion neurons. *NeuroToxicology* 2013;39:124–31. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.09.001>.
- [29] Iijima Y, Bandow K, Amano S, Sano M, Hino S, Kaneko T, et al. Protection of bortezomib-induced neurotoxicity by antioxidants. *Anticancer Research* 2020;40:3685–96. <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.14357>.
- [30] Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E. Neuronal calcium signaling: Function and dysfunction. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2014. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1550-7>.
- [31] Chine VB, Au NPB, Ma CHE. Therapeutic benefits of maintaining mitochondrial integrity and calcium homeostasis by forced expression of Hsp27 in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Neurobiology of Disease* 2019;130:104492. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104492>.
- [32] Carozzi VA, Canta A, Chiorazzi A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? *Neuroscience Letters* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.014>.
- [33] Magi S, Castaldo P, MacRi ML, Maiolino M, Matteucci A, Bastioli G, et al. Intracellular Calcium Dysregulation: Implications for Alzheimer’s Disease. *BioMed Research International* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6701324>.
- [34] Han CH, Khwaounjoo P, Hill AG, Miskelly GM, McKeage MJ. Predicting effects on oxaliplatin clearance: In vitro, kinetic and clinical studies of calcium- and magnesium-mediated oxaliplatin degradation. *Scientific Reports* 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04383-4>.
- [35] Piccolo J, Kolesar JM. Prevention and treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *American Journal of Health-System Pharmacy* 2014;71:19–25. <https://doi.org/10.2146/ajhp130126>.
- [36] Schmitt L-I, Leo M, Kleinschnitz C, Hagenacker T. Oxaliplatin Modulates the Characteristics of Voltage-Gated Calcium Channels and Action Potentials in Small Dorsal Root Ganglion Neurons of Rats. *Molecular Neurobiology* 2018;55:8842–55. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1029-5>.
- [37] Kim W. Effect of Oxaliplatin on Voltage-Gated Sodium Channels in Peripheral Neuropathic Pain. *Processes* 2020;8:680. <https://doi.org/10.3390/pr8060680>.
- [38] Kawashiri T, Egashiral N, Watanabe H, Ikegami Y, Hirakawa S, Mihara Y, et al. Prevention of oxaliplatin-induced mechanical allodynia and neurodegeneration by neurotrophin in the rat model. *European Journal of Pain* 2011;15:344–50. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2010.08.006>.
- [39] Gould SA, White M, Wilbrey AL, Pór E, Coleman MP, Adalbert R. Protection against oxaliplatin-induced mechanical and thermal hypersensitivity in Sarm1^{-/-} mice. *Experimental Neurology* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113607>.
- [40] Gerdts J, Brace EJ, Sasaki Y, DiAntonio A, Milbrandt J. SARM1 activation triggers axon degeneration locally via NAD⁺ destruction. *Science* (1979) 2015. <https://doi.org/10.1126/science.1258366>.
- [41] Gerdts J, Summers DW, Sasaki Y, DiAntonio A, Milbrandt J. Sarm1-Mediated Axon Degeneration

- Requires Both SAM and TIR Interactions. *Journal of Neuroscience* 2013;33:13569–80. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1197-13.2013>.
- [42] Geisler S, Doan RA, Strickland A, Huang X, Milbrandt J, DiAntonio A. Prevention of vincristine-induced peripheral neuropathy by genetic deletion of SARM1 in mice. *Brain* 2016;139:3092–108. <https://doi.org/10.1093/brain/aww251>.
- [43] Gilley J, Mayer PR, Yu G, Coleman MP. Low levels of NMNAT2 compromise axon development and survival. *Human Molecular Genetics* 2019;28:448–58. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy356>.
- [44] Cetinkaya-Fisgin A, Luan X, Reed N, Jeong YE, Oh BC, Hoke A. Cisplatin induced neurotoxicity is mediated by Sarm1 and calpain activation. *Scientific Reports* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78896-w>.
- [45] Ferreira RS, dos Santos NAG, Martins NM, Fernandes LS, dos Santos AC. Non-cytotoxic Concentration of Cisplatin Decreases Neuroplasticity-Related Proteins and Neurite Outgrowth Without Affecting the Expression of NGF in PC12 Cells. *Neurochemical Research* 2016. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2019-5>.
- [46] Turkiew E, Falconer D, Reed N, Höke A. Deletion of Sarm1 gene is neuroprotective in two models of peripheral neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2017;22:162–71. <https://doi.org/10.1111/jns.12219>.
- [47] Argyriou AA, Cavaletti G, Antonacopoulou A, Genazzani AA, Briani C, Bruna J, et al. Voltage-gated sodium channel polymorphisms play a pivotal role in the development of oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity: Results from a prospective multicenter study. *Cancer* 2013;119:3570–7. <https://doi.org/10.1002/cncr.28234>.
- [48] Descoeur J, Pereira V, Pizzoccaro A, Francois A, Ling B, Maffre V, et al. Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Molecular Medicine* 2011. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100134>.
- [49] Poupon L, Lamoine S, Pereira V, Barriere DA, Lolignier S, Giraudet F, et al. Targeting the TREK-1 potassium channel via riluzole to eliminate the neuropathic and depressive-like effects of oxaliplatin. *Neuropharmacology* 2018;140:43–61. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.07.026>.
- [50] Kawashiri T, Egashira N, Kurobe K, Tsutsumi K, Yamashita Y, Ushio S, et al. L Type Ca²⁺ Channel Blockers Prevent Oxaliplatin-Induced Cold Hyperalgesia and TRPM8 Overexpression in Rats. *Molecular Pain* 2012;8:1744-8069-8–7. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-7>.
- [51] Chukyo A, Chiba T, Kambe T, Yamamoto K, Kawakami K, Taguchi K, et al. Oxaliplatin-induced changes in expression of transient receptor potential channels in the dorsal root ganglion as a neuropathic mechanism for cold hypersensitivity. *Neuropeptides* 2018;67:95–101. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2017.12.002>.
- [52] Wu SN, Chen BS, Wu YH, Peng H, Chen LT. The mechanism of the actions of oxaliplatin on ion currents and action potentials in differentiated NG108-15 neuronal cells. *NeuroToxicology* 2009. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.04.010>.
- [53] Nakagawa T, Kaneko S. Roles of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 in Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2017;40:947–53. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00243>.
- [54] Deuis JR, Zimmermann K, Romanovsky AA, Possani LD, Cabot PJ, Lewis RJ, et al. An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for Nav1.6 in peripheral pain pathways. *Pain* 2013;154:1749–57. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.05.032>.
- [55] Aromolaran KA, Goldstein PA. Ion channels and neuronal hyperexcitability in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Molecular Pain* 2017;13:174480691771469. <https://doi.org/10.1177/1744806917714693>.
- [56] Gauchan P, Andoh T, Ikeda K, Fujita M, Sasaki A, Kato A, et al. Mechanical allodynia induced by paclitaxel, oxaliplatin and vincristine: Different effectiveness of gabapentin and different expression of voltage - dependent calcium channel $\alpha 2\delta$ -1 subunit. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2009. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.732>.
- [57] Hao Y, Luo X, Ba X, Wang J, Zhou S, Yang S, et al. Huachansu suppresses TRPV1 up-regulation and spinal astrocyte activation to prevent oxaliplatin-induced peripheral neuropathic pain in rats. *Gene* 2019;680:43–50. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.09.035>.
- [58] Sereno M, Gutiérrez-Gutiérrez G, Rubio JM, Apellániz-Ruiz M, Sánchez-Barroso L, Casado E, et al. Genetic polymorphisms of SCN9A are associated with oxaliplatin-induced neuropathy. *BMC Cancer* 2017;17:63. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-3031-5>.
- [59] Thibault K, Calvino B, Dubacq S, Roualle-De-Rouville M, Sordoillet V, Rivals I, et al. Cortical effect of oxaliplatin associated with sustained neuropathic pain:

- Exacerbation of cortical activity and down-regulation of potassium channel expression in somatosensory cortex. *Pain* 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.04.016>.
- [60] Resta F, Micheli L, Laurino A, Spinelli V, Mello T, Sartiani L, et al. Selective HCN1 block as a strategy to control oxaliplatin-induced neuropathy. *Neuropharmacology* 2018;131:403–13. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.014>.
- [61] Lollignier S, Bonnet C, Gaudioso C, Noël J, Ruel J, Amsalem M, et al. The Nav1.9 Channel Is a Key Determinant of Cold Pain Sensation and Cold Allodynia. *Cell Reports* 2015;11:1067–78. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.027>.
- [62] Kanbara T, Nakamura A, Shibasaki M, Mori T, Suzuki T, Sakaguchi G, et al. Morphine and oxycodone, but not fentanyl, exhibit antinociceptive effects mediated by G-protein inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in an oxaliplatin-induced neuropathy rat model. *Neuroscience Letters* 2014. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.08.005>.
- [63] Pereira V, Busserolles J, Christin M, Devilliers M, Poupon L, Legha W, et al. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *Pain* 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.013>.
- [64] Ling J, Erol F, Viatchenko-Karpinski V, Kanda H, Gu JG. Orofacial neuropathic pain induced by oxaliplatin: Downregulation of KCNQ2 channels in V2 trigeminal ganglion neurons and treatment by the KCNQ2 channel potentiator retigabine. *Molecular Pain* 2017. <https://doi.org/10.1177/1744806917724715>.
- [65] Abd-Elsayed AA, Ikeda R, Jia Z, Ling J, Zuo X, Li M, et al. KCNQ channels in nociceptive cold-sensing trigeminal ganglion neurons as therapeutic targets for treating orofacial cold hyperalgesia. *Molecular Pain* 2015. <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0048-8>.
- [66] Liang F, Schulte BA, Qu C, Hu W, Shen Z. Inhibition of the calcium- and voltage-dependent big conductance potassium channel ameliorates cisplatin-induced apoptosis in spiral ligament fibrocytes of the cochlea. *Neuroscience* 2005. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.05.055>.
- [67] Flávio AGC, Cunha FQ, Francescato HDC, Soares TJ, Costa RS, Barbosa F, et al. ATP-sensitive potassium channel blockage attenuates cisplatin-induced renal damage. *Kidney and Blood Pressure Research* 2007. <https://doi.org/10.1159/000105816>.
- [68] Leo M, Schmitt L-I, Erkel M, Melnikova M, Thomale J, Hagenacker T. Cisplatin-induced neuropathic pain is mediated by upregulation of N-type voltage-gated calcium channels in dorsal root ganglion neurons. *Experimental Neurology* 2017;288:62–74. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.11.003>.
- [69] Ta LE, Bieber AJ, Carlton SM, Loprinzi CL, Low PA, Windebank AJ. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. *Molecular Pain* 2010. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-15>.
- [70] Nassini R, Gees M, Harrison S, De Siena G, Materazzi S, Moretto N, et al. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *Pain* 2011;152:1621–31. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.02.051>.
- [71] Li Y, North RY, Rhines LD, Tatsui CE, Rao G, Edwards DD, et al. DRG Voltage-Gated Sodium Channel 1.7 Is Upregulated in Paclitaxel-Induced Neuropathy in Rats and in Humans with Neuropathic Pain. *The Journal of Neuroscience* 2018;38:1124–36. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0899-17.2017>.
- [72] Wang GJ, Zhang X, Huang L-D, Xiao Y. Involvement of the Sodium Channel Nav1.7 in Paclitaxel-induced Peripheral Neuropathy through ERK1/2 Signaling in Rats. *Current Neurovascular Research* 2020;17:267–74. <https://doi.org/10.2174/1567202617666200514113441>.
- [73] Zhang H, Dougherty PM. Enhanced Excitability of Primary Sensory Neurons and Altered Gene Expression of Neuronal Ion Channels in Dorsal Root Ganglion in Paclitaxel-induced Peripheral Neuropathy. *Anesthesiology* 2014;120:1463–75. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000176>.
- [74] Okubo K, Takahashi T, Sekiguchi F, Kanaoka D, Matsunami M, Ohkubo T, et al. Inhibition of T-type calcium channels and hydrogen sulfide-forming enzyme reverses paclitaxel-evoked neuropathic hyperalgesia in rats. *Neuroscience* 2011. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.004>.
- [75] Li Y, Tatsui CE, Rhines LD, North RY, Harrison DS, Cassidy RM, et al. Dorsal root ganglion neurons become hyperexcitable and increase expression of voltage-gated T-type calcium channels (Cav3.2) in paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *PAIN* 2017;158:417–29. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000774>.
- [76] Chen Y, Yang C, Wang ZJ. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience* 2011. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.085>.

- [77] Materazzi S, Fusi C, Benemei S, Pedretti P, Patacchini R, Nilius B, et al. TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2012;463:561–9. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-1071-x>.
- [78] Zhang XL, Cao XY, Lai RC, Xie MX, Zeng WA. Puerarin relieves paclitaxel-induced neuropathic pain: The role of Nav1.8 β 1 subunit of sensory neurons. *Frontiers in Pharmacology* 2019. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01510>.
- [79] Kawakami K, Chiba T, Katagiri N, Saduka M, Abe K, Utsunomiya I, et al. Paclitaxel increases high voltage-dependent calcium channel current in dorsal root ganglion neurons of the rat. *Journal of Pharmacological Sciences* 2012. <https://doi.org/10.1254/jphs.12123FP>.
- [80] Li Y, Adamek P, Zhang H, Tatsui CE, Rhines LD, Mrozkova P, et al. The Cancer Chemotherapeutic Paclitaxel Increases Human and Rodent Sensory Neuron Responses to TRPV1 by Activation of TLR4. *Journal of Neuroscience* 2015;35:13487–500. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1956-15.2015>.
- [81] Li Y, Yin C, Li X, Liu B, Wang J, Zheng X, et al. Electroacupuncture alleviates paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain in rats via suppressing TLR4 signaling and TRPV1 upregulation in sensory neurons. *International Journal of Molecular Sciences* 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20235917>.
- [82] Salat K, Filipek B. Antinociceptive activity of transient receptor potential channel TRPV1, TRPA1, and TRPM8 antagonists in neurogenic and neuropathic pain models in mice. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 2015;16:167–78. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400189>.
- [83] Chen L, Huang J, Benson C, Lankford KL, Zhao P, Carrara J, et al. Sodium channel Nav1.6 in sensory neurons contributes to vincristine-induced allodynia. *Brain* 2020;143:2421–36. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa208>.
- [84] Wang Y, Feng C, He H, He J, Wang J, Li X, et al. Sensitization of TRPV1 receptors by TNF- α orchestrates the development of vincristine-induced pain. *Oncology Letters* 2018. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7986>.
- [85] Chiba T, Oka Y, Sashida H, Kanbe T, Abe K, Utsunomiya I, et al. Vincristine-induced peripheral neuropathic pain and expression of transient receptor potential vanilloid 1 in rat. *Journal of Pharmacological Sciences* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.03.004>.
- [86] Flatters SJL, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 2004. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.01.029>.
- [87] Sharma J, Maslov LN, Singh N, Jaggi AS. Pain attenuating actions of vincristinet-preconditioning in chemotherapeutic agent-induced neuropathic pain: key involvement of T-type calcium channels. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2020;34:336–44. <https://doi.org/10.1111/fcp.12519>.
- [88] Amir Khanloo F, Karimi G, Yousefi-Manesh H, Abdollahi A, Roohbakhsh A, Dehpour AR. The protective effect of modafinil on vincristine-induced peripheral neuropathy in rats: A possible role for TRPA1 receptors. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 2020. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13454>.
- [89] Alessandri-Haber N, Dina OA, Joseph EK, Reichling DB, Levine JD. Interaction of Transient Receptor Potential Vanilloid 4, Integrin, and Src Tyrosine Kinase in Mechanical Hyperalgesia. *Journal of Neuroscience* 2008;28:1046–57. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4497-07.2008>.
- [90] Tomita S, Sekiguchi F, Deguchi T, Miyazaki T, Ikeda Y, Tsubota M, et al. Critical role of Cav3.2 T-type calcium channels in the peripheral neuropathy induced by bortezomib, a proteasome-inhibiting chemotherapeutic agent, in mice. *Toxicology* 2019;413:33–9. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.12.003>.
- [91] Quartu M, Carozzi VA, Dorsey SG, Serra MP, Poddighe L, Picci C, et al. Bortezomib treatment produces nocifensive behavior and changes in the expression of TRPV1, CGRP, and substance P in the Rat DRG, spinal cord, and sciatic nerve. *BioMed Research International* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/180428>.
- [92] Li C, Deng T, Shang Z, Wang D, Xiao Y. Blocking TRPA1 and TNF- α signal improves bortezomib-induced neuropathic pain. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2018. <https://doi.org/10.1159/000495828>.
- [93] Liu D, Sun M, Xu D, Ma X, Gao D, Yu H. Inhibition of TRPA1 and IL-6 signal alleviates neuropathic pain following chemotherapeutic Bortezomib. *Physiological Research* 2019. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934015>.
- [94] Colvin LA, Johnson PRE, Mitchell R, Fleetwood-Walker SM, Fallon M. From bench to bedside: A case of rapid reversal of bortezomib-induced neuropathic pain by the TRPM8 activator, menthol. *Journal of Clinical Oncology* 2008. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.5017>.

- [95] Xie W, Strong JA, Zhang JM. Local knockdown of the Nav1.6 sodium channel reduces pain behaviors, sensory neuron excitability, and sympathetic sprouting in rat models of neuropathic pain. *Neuroscience* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.010>.
- [96] Li L, Shao J, Wang J, Liu Y, Zhang Y, Zhang M, et al. MiR-30b-5p attenuates oxaliplatin-induced peripheral neuropathic pain through the voltage-gated sodium channel Nav1.6 in rats. *Neuropharmacology* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.04.024>.
- [97] Furgała A, Fijałkowski Ł, Nowaczyk A, Sałat R, Sałat K. Time-shifted co-administration of sub-analgesic doses of ambroxol and pregabalin attenuates oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018;106:930–40. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.039>.
- [98] Gebremedhn EG, Shortland PJ, Mahns DA. The incidence of acute oxaliplatin-induced neuropathy and its impact on treatment in the first cycle: A systematic review. *BMC Cancer* 2018. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4185-0>.
- [99] Bennedsgaard K, Ventzel L, Grafe P, Tigerholm J, Themistocleous AC, Bennett DL, et al. Cold aggravates abnormal excitability of motor axons in oxaliplatin-treated patients. *Muscle and Nerve* 2020. <https://doi.org/10.1002/mus.26852>.
- [100] Greene DL, Hoshi N. Modulation of Kv7 channels and excitability in the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2017. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2359-y>.
- [101] Yamamoto K, Tsuboi M, Kambe T, Abe K, Nakatani Y, Kawakami K, et al. Oxaliplatin administration increases expression of the voltage-dependent calcium channel $\alpha 2\delta$ -1 subunit in the rat spinal cord. *Journal of Pharmacological Sciences* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2016.01.006>.
- [102] Story G. The Emerging Role of TRP Channels in Mechanisms of Temperature and Pain Sensation. *Current Neuropharmacology* 2006. <https://doi.org/10.2174/157015906778019482>.
- [103] Zhao M, Isami K, Nakamura S, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Acute Cold Hypersensitivity Characteristically Induced by Oxaliplatin is Caused by the Enhanced Responsiveness of TRPA1 in Mice. *Molecular Pain* 2012;8:1744-8069-8-55. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-55>.
- [104] Yamamoto K, Chiba N, Chiba T, Kambe T, Abe K, Kawakami K, et al. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 that is Induced in Dorsal Root Ganglion Neurons Contributes to Acute Cold Hypersensitivity after Oxaliplatin Administration. *Molecular Pain* 2015;11:s12990-015-0072. <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0072-8>.
- [105] Chen K, Zhang ZF, Liao MF, Yao WL, Wang J, Wang XR. Blocking PAR2 attenuates oxaliplatin-induced neuropathic pain via TRPV1 and releases of substance P and CGRP in superficial dorsal horn of spinal cord. *Journal of the Neurological Sciences* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.03.029>.
- [106] Ataizi ZS, Ertlav K. Pregabalin reduces oxaliplatin-induced oxidative neurotoxicity through modulation of TRPV1 channels in DBTRG neuronal cell line. *Anti-Cancer Drugs* 2020. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000949>.
- [107] Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: Interactions at the axon level. *Progress in Neurobiology* 2012;98:16–37. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.05.005>.
- [108] Lees JG, Makker PGS, Tonkin RS, Abdulla M, Park SB, Goldstein D, et al. Immune-mediated processes implicated in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *European Journal of Cancer* 2017;73:22–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.12.006>.
- [109] Galluzzi L, Humeau J, Buqué A, Zitvogel L, Kroemer G. Immunostimulation with chemotherapy in the era of immune checkpoint inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0413-z>.
- [110] Hato S V., de Vries IJM, Lesterhuis WJ. STATing the importance of immune modulation by platinum chemotherapeutics. *Oncolimmunology* 2012;1:234–6. <https://doi.org/10.4161/onci.1.2.18126>.
- [111] Stojanovska V, Prakash M, McQuade R, Fraser S, Apostolopoulos V, Sakkal S, et al. Oxaliplatin Treatment Alters Systemic Immune Responses. *BioMed Research International* 2019;2019:1–15. <https://doi.org/10.1155/2019/4650695>.
- [112] Bencardino K, Mauri G, Amatu A, Tosi F, Bonazzina E, Palmeri L, et al. Oxaliplatin Immune-Induced Syndrome Occurs With Cumulative Administration and Rechallenge: Single Institution Series and Systematic Review Study. *Clinical Colorectal Cancer* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.02.001>.
- [113] Starobova H, Mueller A, Deuis JR, Carter DA, Vetter I. Inflammatory and Neuropathic Gene Expression Signatures of Chemotherapy-Induced Neuropathy Induced by Vincristine, Cisplatin, and Oxaliplatin in C57BL/6J Mice. *The Journal of Pain* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.06.008>.
- [114] Boyette-Davis JA, Walters ET, Dougherty PM. Mechanisms involved in the development of

- chemotherapy-induced neuropathy. *Pain Management* 2015;5:285–96. <https://doi.org/10.2217/pmt.15.19>.
- [115] Brandolini L, d'Angelo M, Antonosante A, Cimini A, Allegretti M. Chemokine Signaling in Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20:2904. <https://doi.org/10.3390/ijms20122904>.
- [116] Ji RR, Donnelly CR, Nedergaard M. Astrocytes in chronic pain and itch. *Nature Reviews Neuroscience* 2019. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0218-1>.
- [117] Makker PGS, Duffy SS, Lees JG, Perera CJ, Tonkin RS, Butovsky O, et al. Characterisation of Immune and Neuroinflammatory Changes Associated with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *PLoS ONE* 2017;12. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0170814>.
- [118] Illias AM, Gist AC, Zhang H, Kosturakis AK, Dougherty PM. Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in the dorsal root ganglion contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity. *PAIN* 2018;159:1308–16. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001212>.
- [119] Zhang H, Boyette-Davis JA, Kosturakis AK, Li Y, Yoon S-Y, Walters ET, et al. Induction of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) and Its Receptor CCR2 in Primary Sensory Neurons Contributes to Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *The Journal of Pain* 2013;14:1031–44. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.03.012>.
- [120] Boyette-Davis JA, Hou S, Abdi S, Dougherty PM. An updated understanding of the mechanisms involved in chemotherapy-induced neuropathy. *Pain Management* 2018. <https://doi.org/10.2217/pmt-2018-0020>.
- [121] Zhang H, Li Y, De Carvalho-Barbosa M, Kavelaars A, Heijnen CJ, Albrecht PJ, et al. Dorsal Root Ganglion Infiltration by Macrophages Contributes to Paclitaxel Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Journal of Pain* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2016.02.011>.
- [122] Wang Y song, Li Y yuan, Cui W, Li L bin, Zhang Z cai, Tian B ping, et al. Melatonin Attenuates Pain Hypersensitivity and Decreases Astrocyte-Mediated Spinal Neuroinflammation in a Rat Model of Oxaliplatin-Induced Pain. *Inflammation* 2017;40:2052–61. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0645-y>.
- [123] Montague K, Simeoli R, Valente J, Malcangio M. A novel interaction between CX3CR1 and CCR2 signalling in monocytes constitutes an underlying mechanism for persistent vincristine-induced pain. *Journal of Neuroinflammation* 2018;15:101. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1116-6>.
- [124] Doyle SL, O'Neill LAJ. Toll-like receptors: From the discovery of NFκB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochemical Pharmacology* 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.07.010>.
- [125] Leifer CA, Medvedev AE. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *Journal of Leukocyte Biology* 2016. <https://doi.org/10.1189/jlb.2mr0316-117rr>.
- [126] Sorge RE, LaCroix-Fralish ML, Tuttle AH, Sotocinal SG, Austin J-S, Ritchie J, et al. Spinal Cord Toll-Like Receptor 4 Mediates Inflammatory and Neuropathic Hypersensitivity in Male But Not Female Mice. *Journal of Neuroscience* 2011;31:15450–4. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3859-11.2011>.
- [127] Bruno K, Woller SA, Miller YI, Yaksh TL, Wallace M, Beaton G, et al. Targeting toll-like receptor-4 (TLR4)-an emerging therapeutic target for persistent pain states. *Pain* 2018. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001306>.
- [128] Thakur KK, Saini J, Mahajan K, Singh D, Jayswal DP, Mishra S, et al. Therapeutic implications of toll-like receptors in peripheral neuropathic pain. *Pharmacological Research* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.019>.
- [129] Li Y, Zhang H, Zhang H, Kosturakis AK, Jawad AB, Dougherty PM. Toll-like receptor 4 signaling contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Journal of Pain* 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.04.001>.
- [130] Starobova H, Mueller A, Allavena R, Lohman RJ, Sweet MJ, Vetter I. Minocycline Prevents the Development of Mechanical Allodynia in Mouse Models of Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy. *Frontiers in Neuroscience* 2019;13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00653>.
- [131] Stojanovska V, McQuade RM, Fraser S, Prakash M, Gondalia S, Stavely R, et al. Oxaliplatin-induced changes in microbiota, TLR4+ cells and enhanced HMGB1 expression in the murine colon. *PLOS ONE* 2018;13:e0198359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198359>.
- [132] Sorge RE, Mapplebeck JCS, Rosen S, Beggs S, Taves S, Alexander JK, et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nature Neuroscience* 2015. <https://doi.org/10.1038/nn.4053>.

- [133] Luo X, Huh Y, Bang S, He Q, Zhang L, Matsuda M, et al. Macrophage Toll-like Receptor 9 Contributes to Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain in Male Mice. *The Journal of Neuroscience* 2019;39:6848–64. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3257-18.2019>.
- [134] Laumet G, Edralin JD, Dantzer R, Heijnen CJ, Kavelaars A. Cisplatin educates CD8+ T cells to prevent and resolve chemotherapy-induced peripheral neuropathy in mice. *PAIN* 2019;160:1459–68. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001512>.
- [135] Krukowski K, Eijkelkamp N, Laumet G, Hack CE, Li Y, Dougherty PM, et al. CD8+ T Cells and Endogenous IL-10 Are Required for Resolution of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *Journal of Neuroscience* 2016;36:11074–83. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3708-15.2016>.
- [136] Laumet G, Ma J, Robison AJ, Kumari S, Heijnen CJ, Kavelaars A. T Cells as an Emerging Target for Chronic Pain Therapy. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2019;12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00216>.
- [137] Basso L, Garnier L, Bessac A, Boué J, Blanpied C, Cenac N, et al. T-lymphocyte-derived enkephalins reduce Th1/Th17 colitis and associated pain in mice. *Journal of Gastroenterology* 2018;53:215–26. <https://doi.org/10.1007/s00535-017-1341-2>.
- [138] Boué J, Blanpied C, Brousset P, Vergnolle N, Dietrich G. Endogenous Opioid-Mediated Analgesia Is Dependent on Adaptive T Cell Response in Mice. *The Journal of Immunology* 2011. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003335>.
- [139] Boué J, Blanpied C, Djata-Cabral M, Pelletier L, Vergnolle N, Dietrich G. Immune conditions associated with CD4 + T effector-induced opioid release and analgesia. *Pain* 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.11.013>.
- [140] Labuz D, Schmidt Y, Schreiter A, Rittner HL, Mousa SA, Machelska H. Immune cell-derived opioids protect against neuropathic pain in mice. *J Clin Invest* 2009;119:278–86. <https://doi.org/10.1172/JCI36246>.
- [141] Rosen SF, Ham B, Haichin M, Walters IC, Tohyama S, Sotocinal SG, et al. Increased pain sensitivity and decreased opioid analgesia in T-cell-deficient mice and implications for sex differences. *Pain* 2019. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001420>.
- [142] Robinson CR, Zhang H, Dougherty PM. Astrocytes, but not microglia, are activated in oxaliplatin and bortezomib-induced peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience* 2014;274:308–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.051>.
- [143] Janes K, Wahlman C, Little JW, Doyle T, Tosh DK, Jacobson KA, et al. Spinal neuroimmune activation is independent of T-cell infiltration and attenuated by A3 adenosine receptor agonists in a model of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Brain, Behavior, and Immunity* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.08.010>.
- [144] Zhang H, Yoon SY, Zhang H, Dougherty PM. Evidence that spinal astrocytes but not microglia contribute to the pathogenesis of paclitaxel-induced painful neuropathy. *Journal of Pain* 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2011.12.002>.
- [145] Yan X, Li F, Maixner DW, Yadav R, Gao M, Ali MW, et al. Interleukin-1beta released by microglia initiates the enhanced glutamatergic activity in the spinal dorsal horn during paclitaxel-associated acute pain syndrome. *Glia* 2019;67:482–97. <https://doi.org/10.1002/glia.23557>.
- [146] Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nature Medicine* 2017. <https://doi.org/10.1038/nm.4397>.
- [147] Kabba JA, Xu Y, Christian H, Ruan W, Chenai K, Xiang Y, et al. Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2018. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0504-2>.
- [148] Di Cesare Mannelli L, Pacini A, Micheli L, Tani A, Zanardelli M, Ghelardini C. Glial role in oxaliplatin-induced neuropathic pain. *Experimental Neurology* 2014;261:22–33. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.06.016>.
- [149] Qin B, Li Y, Liu X, Gong D, Zheng W. Notch activation enhances microglial CX3CR1/P38 MAPK pathway in rats model of vincristine-induced peripheral neuropathy. *Neuroscience Letters* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134624>.
- [150] Hu L-Y, Zhou Y, Cui W-Q, Hu X-M, Du L-X, Mi W-L, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) dependent microglial activation promotes cisplatin-induced peripheral neuropathy in mice. *Brain Behav Immun* 2018;68:132–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.011>.
- [151] Sommer C. Serotonin in pain and analgesia: Actions in the periphery. *Molecular Neurobiology* 2004. <https://doi.org/10.1385/MN:30:2:117>.
- [152] Attal N. Pharmacological treatments of neuropathic pain: The latest recommendations. *Revue Neurologique* 2019;175:46–50. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.08.005>.
- [153] Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nature*

- Reviews Disease Primers 2017;3:17002. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>.
- [154] Obata H. Analgesic Mechanisms of Antidepressants for Neuropathic Pain. *International Journal of Molecular Sciences* 2017;18:2483. <https://doi.org/10.3390/ijms18112483>.
- [155] Sałat K, Kołaczowski M, Furgała A, Rojek A, Śniecikowska J, Varney MA, et al. Antinociceptive, antiallodynic and antihyperalgesic effects of the 5-HT_{1A} receptor selective agonist, NLX-112 in mouse models of pain. *Neuropharmacology* 2017;125:181–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.07.022>.
- [156] Martin PY, Doly S, Hamieh AM, Chapuy E, Canale V, Drop M, et al. mTOR activation by constitutively active serotonin₆ receptors as new paradigm in neuropathic pain and its treatment. *Progress in Neurobiology* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101846>.
- [157] Costa-Pereira JT, Serrão P, Martins I, Tavares I. Serotonergic pain modulation from the rostral ventromedial medulla (RVM) in chemotherapy-induced neuropathy: The role of spinal 5-HT₃ receptors. *European Journal of Neuroscience* 2020;51:1756–69. <https://doi.org/10.1111/ejn.14614>.
- [158] Thibault K, Van Steenwinckel J, Brisorgueil MJ, Fischer J, Hamon M, Calvino B, et al. Serotonin 5-HT_{2A} receptor involvement and Fos expression at the spinal level in vincristine-induced neuropathy in the rat. *Pain* 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.09.006>.
- [159] Simonini MV, Polak PE, Sharp A, McGuire S, Galea E, Feinstein DL. Increasing CNS noradrenaline reduces EAE severity. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 2010. <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9182-2>.
- [160] Zhang TT, Xue R, Zhu L, Li J, Fan QY, Zhong BH, et al. Evaluation of the analgesic effects of amoxetine, a novel potent serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor. *Acta Pharmacologica Sinica* 2016. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.45>.
- [161] Caraci F, Merlo S, Drago F, Caruso G, Parenti C, Sortino MA. Rescue of Noradrenergic System as a Novel Pharmacological Strategy in the Treatment of Chronic Pain: Focus on Microglia Activation. *Frontiers in Pharmacology* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01024>.
- [162] Baba H, Shimoji K, Yoshimura M. Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (Part 1): Effects of axon terminals of GABAergic and glycinergic neurons. *Anesthesiology* 2000. <https://doi.org/10.1097/00000542-200002000-00030>.
- [163] O'Donnell J, Zeppenfeld D, McConnell E, Pena S, Nedergaard M. Norepinephrine: A neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochemical Research* 2012. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0818-x>.
- [164] Mori K, Ozaki E, Zhang B, Yang L, Yokoyama A, Takeda I, et al. Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express α_1 , α_2 , β_1 and β_2 adrenergic receptors. *Neuropharmacology* 2002. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00211-3](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00211-3).
- [165] Pan HL, Wu ZZ, Zhou HY, Chen SR, Zhang HM, Li DP. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacology and Therapeutics* 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.003>.
- [166] Choi S, Yamada A, Kim W, Kim SK, Furue H. Noradrenergic inhibition of spinal hyperexcitation elicited by cutaneous cold stimuli in rats with oxaliplatin-induced allodynia: electrophysiological and behavioral assessments. *Journal of Physiological Sciences* 2017. <https://doi.org/10.1007/s12576-016-0505-9>.
- [167] Ito S, Suto T, Saito S, Obata H. Repeated Administration of Duloxetine Suppresses Neuropathic Pain by Accumulating Effects of Noradrenaline in the Spinal Cord. *Anesthesia and Analgesia* 2018. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002380>.
- [168] Li D, Lee Y, Kim W, Lee K, Bae H, Kim S. Analgesic Effects of Bee Venom Derived Phospholipase A2 in a Mouse Model of Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain. *Toxins (Basel)* 2015;7:2422–34. <https://doi.org/10.3390/toxins7072422>.
- [169] Costa-Pereira JT, Ribeiro J, Martins I, Tavares I. Role of Spinal Cord α_2 -Adrenoreceptors in Noradrenergic Inhibition of Nociceptive Transmission During Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Frontiers in Neuroscience* 2020. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01413>.
- [170] Mannelli L, Micheli L, Crocetti L, Giovannoni M, Vergelli C, Ghelardini C. α_2 Adrenoceptor: a Target for Neuropathic Pain Treatment . *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2016. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160609065535>.
- [171] Sagheddu C, Aroni S, de Felice M, Lecca S, Luchicchi A, Melis M, et al. Enhanced serotonin and mesolimbic dopamine transmissions in a rat model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.06.003>.
- [172] Wawrzczak-Bargieła A, Ziółkowska B, Piotrowska A, Starnowska-Sokół J, Rojewska E, Mika J, et al. Neuropathic Pain Dysregulates Gene Expression of the

- Forebrain Opioid and Dopamine Systems. Neurotoxicity Research 2020. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00166-4>.
- [173] Sałat K, Furgała A, Sałat R. Interventional and preventive effects of aripiprazole and ceftriaxone used alone or in combination on oxaliplatin-induced tactile and cold allodynia in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019;111:882–90. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.008>.
- [174] Khalilzadeh M, Hassanzadeh F, Aghamiri H, Dehpour AR, Shafaroodi H. Aripiprazole prevents from development of vincristine-induced neuropathic nociception by limiting neural NOS overexpression and NF-κB hyperactivation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2020. <https://doi.org/10.1007/s00280-020-04127-8>.
- [175] Hoshino H, Obata H, Nakajima K, Mieda R, Saito S. The antihyperalgesic effects of intrathecal bupropion, a dopamine and noradrenaline reuptake inhibitor, in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesia and Analgesia* 2015. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000540>.
- [176] Horishita T, Yanagihara N, Ueno S, Okura D, Horishita R, Minami T, et al. Antidepressants inhibit Nav1.3, Nav1.7, and Nav1.8 neuronal voltage-gated sodium channels more potently than Nav1.2 and Nav1.6 channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2017;390:1255–70. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1424-x>.
- [177] North RY, Lazaro TT, Dougherty PM. Ectopic spontaneous afferent activity and neuropathic pain. *Clinical Neurosurgery*, 2018. <https://doi.org/10.1093/neuros/nyy119>.
- [178] Urits I, Peck J, Orhurhu MS, Wolf J, Patel R, Orhurhu V, et al. Off-label Antidepressant Use for Treatment and Management of Chronic Pain: Evolving Understanding and Comprehensive Review. *Current Pain and Headache Reports* 2019;23:1–10. <https://doi.org/10.1007/s11916-019-0803-z>.
- [179] Barygin OI, Nagaeva EI, Tikhonov DB, Belinskaya DA, Vanchakova NP, Shestakova NN. Inhibition of the NMDA and AMPA receptor channels by antidepressants and antipsychotics. *Brain Research* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.01.028>.
- [180] Dharmshaktu P, Tayal V, Kalra BS. Efficacy of antidepressants as analgesics: A review. *Journal of Clinical Pharmacology* 2012. <https://doi.org/10.1177/0091270010394852>.
- [181] Saarto T, Wiffen PJ. Antidepressants for neuropathic pain. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005454.pub2>.
- [182] Sada H, Egashira N, Ushio S, Kawashiri T, Shirahama M, Oishi R. Repeated administration of amitriptyline reduces oxaliplatin-induced mechanical allodynia in rats. *Journal of Pharmacological Sciences* 2012. <https://doi.org/10.1254/jphs.12006SC>.
- [183] Furgała A, Sałat R, Sałat K. Acute cold allodynia induced by oxaliplatin is attenuated by amitriptyline. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2018;78:315–21.
- [184] Kautio AL, Haanpää M, Saarto T, Kalso E. Amitriptyline in the Treatment of Chemotherapy-Induced Neuropathic Symptoms. *Journal of Pain and Symptom Management* 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2007.02.043>.
- [185] Hammack JE, Michalak JC, Loprinzi CL, Sloan JA, Novotny PJ, Soori GS, et al. Phase III evaluation of nortriptyline for alleviation of symptoms of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *Pain* 2002. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(02\)00047-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(02)00047-7).
- [186] Mercadante S. Topical amitriptyline and ketamine for the treatment of neuropathic pain. *Expert Review of Neurotherapeutics* 2015. <https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1101347>.
- [187] Barton DL, Wos EJ, Qin R, Mattar BI, Green NB, Lanier KS, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of a topical treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: NCCTG trial N06CA. *Supportive Care in Cancer* 2011. <https://doi.org/10.1007/s00520-010-0911-0>.
- [188] Rossignol J, Cozzi B, Liebaert F, Hatton S, Viallard ML, Hermine O, et al. High concentration of topical amitriptyline for treating chemotherapy-induced neuropathies. *Supportive Care in Cancer* 2019. <https://doi.org/10.1007/s00520-018-4618-y>.
- [189] Genevois A-L, Ruel J, Penalba V, Hatton S, Petitfils C, Ducrocq M, et al. Analgesic Effects of Topical Amitriptyline in Patients With Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: Mechanistic Insights From Studies in Mice. *The Journal of Pain* 2021;22:440–53. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2020.11.002>.
- [190] Knadler MP, Lobo E, Chappell J, Bergstrom R. Duloxetine: Clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Clinical Pharmacokinetics* 2011. <https://doi.org/10.2165/11539240-000000000-00000>.
- [191] Hu L-Y, Mi W-L, Wu G-C, Wang Y-Q, Mao-Ying Q-L. Prevention and Treatment for Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: Therapies Based on CIPN

- Mechanisms. *Current Neuropharmacology* 2019;17:184–96. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170915143217>.
- [192] Holliday SM, Benfield P. Venlafaxine: A Review of its Pharmacology and Therapeutic Potential in Depression. *Drugs* 1995. <https://doi.org/10.2165/00003495-199549020-00010>.
- [193] Jaberpreet S. Dhaliwal, Benjamin C. Spurling, Mohammed Molla. Duloxetine - StatPearls - NCBI Bookshelf. StatPearls [Internet] 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549806/> (accessed November 17, 2020).
- [194] Fda. Cymbalta (duloxetine hydrochloride) capsules. n.d.
- [195] Meng J, Zhang Q, Yang C, Xiao L, Xue Z, Zhu J. Duloxetine, a Balanced Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitor, Improves Painful Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy by Inhibiting Activation of p38 MAPK and NF- κ B. *Frontiers in Pharmacology* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00365>.
- [196] Greish S, Abogresha N, Zaitone S. Duloxetine Modulates Vincristine-Induced Painful Neuropathy in Rats. *Journal of Physiology and Pharmacology Advances* 2014. <https://doi.org/10.5455/jppa.20140702125046>.
- [197] Yamamoto S, Kawashiri T, Higuchi H, Tsutsumi K, Ushio S, Kaname T, et al. Behavioral and pharmacological characteristics of bortezomib-induced peripheral neuropathy in rats. *Journal of Pharmacological Sciences* 2015;129:43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.08.006>.
- [198] Smith EML, Pang H, Cirrincione C, Fleishman S, Paskett ED, Ahles T, et al. Effect of Duloxetine on Pain, Function, and Quality of Life Among Patients With Chemotherapy-Induced Painful Peripheral Neuropathy. *JAMA* 2013;309:1359. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2813>.
- [199] Yang YH, Lin JK, Chen WS, Lin TC, Yang SH, Jiang JK, et al. Duloxetine improves oxaliplatin-induced neuropathy in patients with colorectal cancer: An open-label pilot study. *Supportive Care in Cancer* 2012. <https://doi.org/10.1007/s00520-011-1237-2>.
- [200] Otake A, Yoshino K, Ueda Y, Sawada K, Mabuchi S, Kimura T, et al. Usefulness of duloxetine for Paclitaxel-induced peripheral neuropathy treatment in gynecological cancer patients. *Anticancer Res* 2015;35:359–63.
- [201] Hirayama Y, Ishitani K, Sato Y, Iyama S, Takada K, Murase K, et al. Effect of duloxetine in Japanese patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a pilot randomized trial. *International Journal of Clinical Oncology* 2015. <https://doi.org/10.1007/s10147-015-0810-y>.
- [202] Battaglini E, Park SB, Barnes EH, Goldstein D. A double blind, placebo controlled, phase II randomised cross-over trial investigating the use of duloxetine for the treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Contemporary Clinical Trials* 2018;70:135–8. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2018.04.011>.
- [203] Matsuoka H, Ishiki H, Iwase S, Koyama A, Kawaguchi T, Kizawa Y, et al. Study protocol for a multi-institutional, randomised, double-blinded, placebo-controlled phase III trial investigating additive efficacy of duloxetine for neuropathic cancer pain refractory to opioids and gabapentinoids: The DIRECT study. *BMJ Open* 2017. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-017280>.
- [204] Aiyer R, Barkin RL, Bhatia A. Treatment of Neuropathic Pain with Venlafaxine: A Systematic Review. *Pain Medicine* 2016:pnw261. <https://doi.org/10.1093/pm/pnw261>.
- [205] Kus T, Aktas G, Alpak G, Kalender ME, Sevinc A, Kul S, et al. Efficacy of venlafaxine for the relief of taxane and oxaliplatin-induced acute neurotoxicity: a single-center retrospective case–control study. *Supportive Care in Cancer* 2016. <https://doi.org/10.1007/s00520-015-3009-x>.
- [206] Zimmerman C, Atherton PJ, Pachman D, Seisler D, Wagner-Johnston N, Dakhil S, et al. MC11C4: a pilot randomized, placebo-controlled, double-blind study of venlafaxine to prevent oxaliplatin-induced neuropathy. *Supportive Care in Cancer* 2016;24:1071–8. <https://doi.org/10.1007/s00520-015-2876-5>.
- [207] Taylor CP. Mechanisms of analgesia by gabapentin and pregabalin - Calcium channel α 2- δ [Cav α 2- δ] ligands. *Pain* 2009. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.11.019>.
- [208] Backonja M, Glanzman RL. Gabapentin dosing for neuropathic pain: Evidence from randomized, placebo-controlled clinical trials. *Clinical Therapeutics* 2003. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(03\)90011-7](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(03)90011-7).
- [209] Derry S, Bell RF, Straube S, Wiffen PJ, Aldington D, Moore RA. Pregabalin for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2019. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007076.pub3>.

- [210] Verma V, Singh N, Jaggi A. Pregabalin in Neuropathic Pain: Evidences and Possible Mechanisms. *Current Neuropharmacology* 2014. <https://doi.org/10.2174/1570159x1201140117162802>.
- [211] Calandre EP, Rico-Villademoros F, Slim M. Alpha 2 delta ligands, gabapentin, pregabalin and mirogabalin: a review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Expert Review of Neurotherapeutics* 2016;16:1263–77. <https://doi.org/10.1080/14737175.2016.1202764>.
- [212] Evoy KE, Covvey JR, Peckham AM, Ochs L, Hultgren KE. Reports of gabapentin and pregabalin abuse, misuse, dependence, or overdose: An analysis of the Food And Drug Administration Adverse Events Reporting System (FAERS). *Research in Social and Administrative Pharmacy* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2018.06.018>.
- [213] Piskorska B, Miziak B, Czuczwar SJ, Borowicz KK. Safety issues around misuse of antiepileptics. *Expert Opinion on Drug Safety* 2013. <https://doi.org/10.1517/14740338.2013.796363>.
- [214] Bonnet U, Scherbaum N. How addictive are gabapentin and pregabalin? A systematic review. *European Neuropsychopharmacology* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.08.430>.
- [215] Casale R, Symeonidou Z, Bartolo M. Topical Treatments for Localized Neuropathic Pain. *Current Pain and Headache Reports* 2017. <https://doi.org/10.1007/s11916-017-0615-y>.
- [216] Demant DT, Lund K, Finnerup NB, Vollert J, Maier C, Segerdahl MS, et al. Pain relief with lidocaine 5% patch in localized peripheral neuropathic pain in relation to pain phenotype: A randomised, double-blind, and placebo-controlled, phenotype panel study. *Pain* 2015. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000266>.
- [217] de León-Casasola OA, Mayoral V. The topical 5% lidocaine medicated plaster in localized neuropathic pain: A reappraisal of the clinical evidence. *Journal of Pain Research* 2016. <https://doi.org/10.2147/JPR.S99231>.
- [218] Papapetrou P, Kumar AJ, Muppuri R, Chakraborty S. Intravenous Lidocaine Infusion to Treat Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *A Case Report* 2015. <https://doi.org/10.1213/XAA.0000000000000197>.
- [219] Heuvel SASV Den, Wal SEIV Der, Smedes LA, Radema SA, Alfen N Van, Vissers KCP, et al. Intravenous Lidocaine: Old-School Drug, New Purpose-Reduction of Intractable Pain in Patients with Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy. *Pain Research and Management* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8053474>.
- [220] Maihöfner C, Diel I, Tesch H, Quandt T, Baron R. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): current therapies and topical treatment option with high-concentration capsaicin. *Supportive Care in Cancer* 2021. <https://doi.org/10.1007/s00520-021-06042-x>.
- [221] Filipczak-Bryniarska I, Krzyzewski RM, Kucharz J, Michalowska-Kaczmarczyk A, Kleja J, Woron J, et al. High-dose 8% capsaicin patch in treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: single-center experience. *Medical Oncology* 2017. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1015-1>.
- [222] Cabezón-Gutiérrez L, Custodio-Cabello S, Palka-Kotłowska M, Khosravi-Shahi P. High-Dose 8% Capsaicin Patch in Treatment of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *A Systematic Review. Journal of Pain and Symptom Management* 2020;60:1047-1054.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2020.06.026>.
- [223] Bravo L, Mico JA, Berrocoso E. Discovery and development of tramadol for the treatment of pain. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2017;12:1281–91. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1377697>.
- [224] Zbârcea CE, Chiriță C, Ștefănescu E, Șeremet OC, Velescu B Ștefan, Marineci CD, et al. Therapeutic potential of tramadol and dextromethorphan on vincristine induced peripheral neuropathy in rats. *Farmacia* 2018. <https://doi.org/10.31925/FARMACIA.2018.6.17>.
- [225] Zhao M, Nakamura S, Miyake T, So K, Shirakawa H, Tokuyama S, et al. Pharmacological characterization of standard analgesics on oxaliplatin-induced acute cold hypersensitivity in mice. *Journal of Pharmacological Sciences* 2014. <https://doi.org/10.1254/jphs.13249SC>.
- [226] Hooijmans CR, Draper D, Ergün M, Scheffer GJ. The effect of analgesics on stimulus evoked pain-like behaviour in animal models for chemotherapy induced peripheral neuropathy- a meta-analysis. *Scientific Reports* 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54152-8>.
- [227] Naruge D, Nagashima F, Kawai K, Okano N, Kobayashi T, Furuse J. Tramadol/Acetaminophen Combination Tablets in Cancer Patients with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Single-Arm Phase II Study. *Palliative Medicine Reports* 2020. <https://doi.org/10.1089/pmr.2020.0031>.
- [228] Zebala JA, Searle SL, Webster LR, Johnson MS, Schuler AD, Maeda DY, et al. Desmetramadol Has the Safety and Analgesic Profile of Tramadol Without Its

- Metabolic Liabilities: Consecutive Randomized, Double-Blind, Placebo- and Active Comparator-Controlled Trials. *Journal of Pain* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.04.005>.
- [229] Duehmke RM, Derry S, Wiffen PJ, Bell RF, Aldington D, Moore RA. Tramadol for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;6:CD003726. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003726.pub4>.
- [230] Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology* 2015. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70251-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70251-0).
- [231] Cherny NI. Opioid Analgesics: Comparative Features and Prescribing Guidelines. *Drugs* 1996. <https://doi.org/10.2165/00003495-199651050-00002>.
- [232] Doi S, Mori T, Uzawa N, Arima T, Takahashi T, Uchida M, et al. Characterization of methadone as a β -arrestin-biased μ -opioid receptor agonist. *Molecular Pain* 2016. <https://doi.org/10.1177/1744806916654146>.
- [233] Sommer C, Klose P, Welsch P, Petzke F, Häuser W. Opioids for chronic non-cancer neuropathic pain. An updated systematic review and meta-analysis of efficacy, tolerability and safety in randomized placebo-controlled studies of at least 4 weeks duration. *European Journal of Pain* 2020;24:3–18. <https://doi.org/10.1002/ejp.1494>.
- [234] McNicol ED, Midbari A, Eisenberg E. Opioids for neuropathic pain. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006146.pub2>.
- [235] Galiè E, Villani V, Terrenato I, Pace A. Tapentadol in neuropathic pain cancer patients: a prospective open label study. *Neurological Sciences* 2017;38:1747–52. <https://doi.org/10.1007/s10072-017-3035-1>.
- [236] Freo U, Romualdi P, Kress HG. Tapentadol for neuropathic pain: A review of clinical studies. *Journal of Pain Research* 2019. <https://doi.org/10.2147/JPR.S190162>.
- [237] Koch ED, Kapanadze S, Eerdekens MH, Kralidis G, Létal J, Sabatschus I, et al. Cebranopadol, a Novel First-in-Class Analgesic Drug Candidate: First Experience With Cancer-Related Pain for up to 26 Weeks. *Journal of Pain and Symptom Management* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2019.05.012>.
- [238] Lei W, Vekariya RH, Ananthan S, Streicher JM. A Novel Mu-Delta Opioid Agonist Demonstrates Enhanced Efficacy With Reduced Tolerance and Dependence in Mouse Neuropathic Pain Models. *Journal of Pain* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.05.017>.
- [239] Park JH, Park HJ. Botulinum toxin for the treatment of neuropathic pain. *Toxins (Basel)* 2017. <https://doi.org/10.3390/toxins9090260>.
- [240] Oh HM, Chung ME. Botulinum toxin for neuropathic pain: A review of the literature. *Toxins (Basel)* 2015. <https://doi.org/10.3390/toxins7083127>.
- [241] Rojewska E, Piotrowska A, Popiolek-Barczyk K, Mika J. Botulinum toxin type A—a modulator of spinal neuron–glia interactions under neuropathic pain conditions. *Toxins (Basel)* 2018. <https://doi.org/10.3390/toxins10040145>.
- [242] Attal N, de Andrade DC, Adam F, Ranoux D, Teixeira MJ, Galhardoni R, et al. Safety and efficacy of repeated injections of botulinum toxin A in peripheral neuropathic pain (BOTNEP): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology* 2016. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00017-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00017-X).
- [243] Ibrahim EY, Ehrlich BE. Prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A review of recent findings. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.102831>.
- [244] Hu S, Huang KM, Adams EJ, Loprinzi CL, Lustberg MB. Recent developments of novel pharmacologic therapeutics for prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Clinical Cancer Research* 2019. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2152>.
- [245] Hershman DL, Lacchetti C, Dworkin RH, Lavoie Smith EM, Bleeker J, Cavaletti G, et al. Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American society of clinical oncology clinical practice guideline. *Journal of Clinical Oncology* 2014. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.0914>.
- [246] Loprinzi CL, Lacchetti C, Bleeker J, Cavaletti G, Chauhan C, Hertz DL, et al. Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: ASCO Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology* 2020;38:3325–48. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01399>.
- [247] Farshchian N, Alavi A, Heydarheydari S, Moradian N. Comparative study of the effects of venlafaxine and duloxetine on chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2018;82:787–93. <https://doi.org/10.1007/s00280-018-3664-y>.

- [248] Glimelius B, Manojlovic N, Pfeiffer P, Mosidze B, Kurteva G, Karlberg M, et al. Persistent prevention of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy using calmagafodipir (PledOx[®]): a placebo-controlled randomised phase II study (PLIANT). *Acta Oncologica* 2018;57:393–402. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1398836>.
- [249] Qvortrup C, Muro K, Lustberg M, Persson A, Näsström J, Carlsson S, et al. SO-17 The global POLAR program: Top-line results of placebo-controlled studies of calmagafodipir on top of modified FOLFOX6 to prevent chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Annals of Oncology* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.05.041>.
- [250] McCormack PL, Keam SJ. Dasatinib: A review of its use in the treatment of chronic myeloid leukaemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Drugs* 2011. <https://doi.org/10.2165/11207580-000000000-00000>.
- [251] Dasatinib in Preventing Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Patients With Colorectal Cancer Receiving FOLFOX and Bevacizumab - Full Text View - ClinicalTrials.gov n.d. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04164069?term=oxaliplatin%2C+prevention&draw=2> (accessed December 2, 2020).
- [252] Bouchenaki H, Danigo A, Sturtz F, Hajj R, Magy L, Demiot C. An overview of ongoing clinical trials assessing pharmacological therapeutic strategies to manage chemotherapy-induced peripheral neuropathy, based on preclinical studies in rodent models. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2020. <https://doi.org/10.1111/fcp.12617>.
- [253] Leblanc AFM, Huang KM, Gibson AA, Sprowl JA, Sparreboom A, Hu S. Genetic and Pharmacological Inhibition of OCT2 Protects Rats against Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy. *The FASEB Journal* 2019;33:813.9-813.9. https://doi.org/10.1096/FASEBJ.2019.33.1_SUPPLEMENT.813.9.
- [254] Anderson JT, Huang KM, Lustberg MB, Sparreboom A, Hu S. Solute Carrier Transportome in Chemotherapy-Induced Adverse Drug Reactions, Springer, Berlin, Heidelberg; 2020, p. 1–39. https://doi.org/10.1007/112_2020_30.
- [255] Hochhaus A, Saglio G, Hughes TP, Larson RA, Kim DW, Issaragrisil S, et al. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia* 2016. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.5>.
- [256] Leblanc AF, Sprowl JA, Alberti P, Chiorazzi A, Arnold WD, Gibson AA, et al. OATP1B2 deficiency protects against paclitaxel-induced neurotoxicity. *Journal of Clinical Investigation* 2018;128:816–25. <https://doi.org/10.1172/JCI96160>.
- [257] Nilotinib in Preventing Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy in Patients With Stage I-III Breast Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov n.d. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04205903?term=Nilotinib+Paclitaxel&draw=2&rank=2> (accessed December 3, 2020).
- [258] Nagoshi N, Nakashima H, Fehlings M. Riluzole as a Neuroprotective Drug for Spinal Cord Injury: From Bench to Bedside. *Molecules* 2015;20:7775–89. <https://doi.org/10.3390/molecules20057775>.
- [259] Yamamoto S, Egashira N, Tsuda M, Masuda S. Riluzole prevents oxaliplatin-induced cold allodynia via inhibition of overexpression of transient receptor potential melastatin 8 in rats. *Journal of Pharmacological Sciences* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jpshs.2018.10.006>.
- [260] Guo YL, Duan WJ, Lu DH, Ma XH, Li XX, Li Z, et al. Autophagy-dependent removal of α -synuclein: a novel mechanism of GM1 ganglioside neuroprotection against Parkinson's disease. *Acta Pharmacologica Sinica* 2020;1–11. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0454-y>.
- [261] Chentanez V, Thanomsridejchai N, Duangmardphon N, Agthong S, Kaewsema A, Huanmanop T, et al. Ganglioside GM1 (porcine) ameliorates paclitaxel-induced neuropathy in rats. *Journal of the Medical Association of Thailand* 2009.
- [262] Zhu Y, Yang J, Jiao S, Ji T. Ganglioside-monosialic acid (GM1) prevents oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity in patients with gastrointestinal tumors. *World Journal of Surgical Oncology* 2013. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-19>.
- [263] Su Y, Huang J, Wang S, Unger JM, Arias-Fuenzalida J, Shi Y, et al. The Effects of Ganglioside-Monosialic Acid in Taxane-Induced Peripheral Neurotoxicity in Patients with Breast Cancer: A Randomized Trial. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2019;112:55–62. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz086>.
- [264] de Gregorio D, McLaughlin RJ, Posa L, Ochoa-Sanchez R, Enns J, Lopez-Canul M, et al. Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain* 2019. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001386>.
- [265] Boyaji S, Merkow J, Elman RNM, Kaye AD, Yong RJ, Urman RD. The Role of Cannabidiol (CBD) in Chronic

- Pain Management: An Assessment of Current Evidence. *Current Pain and Headache Reports* 2020;24. <https://doi.org/10.1007/s11916-020-0835-4>.
- [266] Peyravian N, Deo S, Daunert S, Jimenez JJ. <p>Cannabidiol as a Novel Therapeutic for Immune Modulation</p>. *ImmunoTargets and Therapy* 2020;Volume 9:131–40. <https://doi.org/10.2147/itt.s263690>.
- [267] Blanton HL, Brelsfoard J, DeTurk N, Pruitt K, Narasimhan M, Morgan DJ, et al. Cannabinoids: Current and Future Options to Treat Chronic and Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *Drugs* 2019;79:969–95. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01132-x>.
- [268] King KM, Myers AM, Soroka-Monzo AJ, Tuma RF, Tallarida RJ, Walker EA, et al. Single and combined effects of Δ9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain. *British Journal of Pharmacology* 2017. <https://doi.org/10.1111/bph.13887>.
- [269] Cannabidiol for Prevention of Chemotherapy-induced Peripheral Neuropathy - Full Text View - ClinicalTrials.gov n.d. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04582591?term=oxaliplatin+prevention&draw=2&rank=12> (accessed December 4, 2020).
- [270] Lidocaine for Oxaliplatin-induced Neuropathy - Full Text View - ClinicalTrials.gov n.d. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03254394?term=oxaliplatin+neuropathy&draw=2> (accessed January 22, 2020).
- [271] Calo G, Lambert DG. Nociceptin/orphanin FQ receptor ligands and translational challenges: focus on cebranopadol as an innovative analgesic. *British Journal of Anaesthesia* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2018.06.024>.
- [272] Sałat K, Furgała A, Sałat R. Evaluation of cebranopadol, a dually acting nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor agonist in mouse models of acute, tonic, and chemotherapy-induced neuropathic pain. *Inflammopharmacology* 2018;26:361–74. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0405-5>.
- [273] Weiser T, Wilson N. Inhibition of tetrodotoxin (TTX)-resistant and TTX-sensitive neuronal Na(+) channels by the secretolytic ambroxol. *Mol Pharmacol* 2002;62:433–8. <https://doi.org/10.1124/mol.62.3.433>.
- [274] Argyriou AA, Kalofonou F, Litsardopoulos P, Anastopoulou GG, Psimaras D, Bruna J, et al. Real world, open label experience with lacosamide against acute painful oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2020;25:178–83. <https://doi.org/10.1111/jns.12374>.
- [275] Alles SRA, Cain SM, Snutch TP. Pregabalin as a Pain Therapeutic: Beyond Calcium Channels. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2020;14:83. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00083>.
- [276] Pergolizzi J V., Magnusson P, LeQuang JA, Razmi R, Zampogna G, Taylor R. Statins and Neuropathic Pain: A Narrative Review. *Pain and Therapy* 2020;9:97–111. <https://doi.org/10.1007/s40122-020-00153-9>.
- [277] Newman-Tancredi A, Bardin L, Auclair A, Colpaert F, Depoortère R, Varney MA. NLX-112, a highly selective 5-HT 1A receptor agonist, mediates analgesia and antidepressant-like activity in rats via spinal cord and prefrontal cortex 5-HT 1A receptors, respectively. *Brain Research* 2018;1688:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.016>.
- [278] Hiroki T, Suto T, Saito S, Obata H. Repeated Administration of Amitriptyline in Neuropathic Pain: Modulation of the Noradrenergic Descending Inhibitory System. *Anesthesia and Analgesia* 2017. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002352>.
- [279] Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, et al. β-Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 2005;433:73–7. <https://doi.org/10.1038/nature03180>.
- [280] Hirose T, Uwahodo Y, Yamada S, Miwa T, Kikuchi T, Kitagawa H, et al. Mechanism of action of aripiprazole predicts clinical efficacy and a favourable side-effect profile. *Journal of Psychopharmacology* 2004. <https://doi.org/10.1177/026988110401800308>.
- [281] Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinänen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *Journal of Neuroscience* 2001. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-08-02580.2001>.
- [282] Mansouri MT, Khodayar MJ, Tabatabaee A, Ghorbanzadeh B, Naghizadeh B. Modulation of morphine antinociceptive tolerance and physical dependence by co-administration of simvastatin. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2015;137:38–43. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.08.002>.
- [283] Sałat K, Cios A, Wyska E, Sałat R, Mogiński S, Filipek B, et al. Antiallodynic and antihyperalgesic activity of 3-[4-(3-trifluoromethyl-phenyl)-piperazin-1-yl]-dihydrofuran-2-one compared to pregabalin in chemotherapy-induced neuropathic pain in mice.

- Pharmacology Biochemistry and Behavior 2014;122:173–81.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.03.025>.
- [284] Thangamani D, Edafiohgo IO, Masocha W. The Anticonvulsant Enaminone E139 Attenuates Paclitaxel-Induced Neuropathic Pain in Rodents. *The Scientific World Journal* 2013;2013:1–8.
<https://doi.org/10.1155/2013/240508>.
- [285] Almeida-Santos AF, Ferreira RCM, Duarte ID, Aguiar DC, Romero TRL, Moreira FA. The antipsychotic aripiprazole induces antinociceptive effects: Possible role of peripheral dopamine D2 and serotonin 5-HT1A receptors. *European Journal of Pharmacology* 2015;765:300–6.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.053>.
- [286] Stepanovic´-Petrovic´ RM, Micov AM, Tomic´ MA, Kovacevic´ JM, Boškovic´ BD. Antihyperalgesic/Antinociceptive Effects of Ceftriaxone and Its Synergistic Interactions with Different Analgesics in Inflammatory Pain in Rodents. *Anesthesiology* 2014;120:737–50.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0000435833.33515.ba>.
- [287] Kim W, Chung Y, Choi S, Min B-I, Kim S. Duloxetine Protects against Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain and Spinal Neuron Hyperexcitability in Rodents. *International Journal of Molecular Sciences* 2017;18:2626.
<https://doi.org/10.3390/ijms18122626>.
- [288] Parvathy SS, Masocha W. Coadministration of indomethacin and minocycline attenuates established paclitaxel-induced neuropathic thermal hyperalgesia: Involvement of cannabinoid CB1 receptors. *Scientific Reports* 2015;5:10541.
<https://doi.org/10.1038/srep10541>.
- [289] Beyreuther BK, Callizot N, Brot MD, Feldman R, Bain SC, Stöhr T. Antinociceptive efficacy of lacosamide in rat models for tumor- and chemotherapy-induced cancer pain. *European Journal of Pharmacology* 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.02.041>.
- [290] Stöhr T, Krause E, Selve N. Lacosamide displays potent antinociceptive effects in animal models for inflammatory pain. *European Journal of Pain* 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.04.002>.
- [291] Sakurai M, Egashira N, Kawashiri T, Yano T, Ikesue H, Oishi R. Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: Involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *Pain* 2009;147:165–74.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.09.003>.
- [292] Furgala - Wojas A, Kowalska M, Nowaczyk A, Fijałkowski Ł, Sałat K. Comparison of Bromhexine and its Active Metabolite - Ambroxol as Potential Analgesics Reducing Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain - Pharmacodynamic and Molecular Docking Studies. *Current Drug Metabolism* 2020;21.
<https://doi.org/10.2174/1389200221666200711155632>.
- [293] Sałat K, Furgala A, Malikowska-Racia N. Searching for analgesic drug candidates alleviating oxaliplatin-induced cold hypersensitivity in mice. *Chemical Biology and Drug Design* 2019:1–12.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.13507>.
- [294] Sałat K, Podkowa A, Kowalczyk P, Kulig K, Dziubina A, Filipek B, et al. Anticonvulsant active inhibitor of GABA transporter subtype 1, tiagabine, with activity in mouse models of anxiety, pain and depression. *Pharmacological Reports* 2015;67:465–72.
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.11.003>.
- [295] Canta A, Chiorazzi A, Pozzi E, Fumagalli G, Monza L, Meregalli C, et al. Calmangafodipir reduces sensory alterations and prevents intraepidermal nerve fibers loss in a mouse model of oxaliplatin induced peripheral neurotoxicity. *Antioxidants* 2020.
<https://doi.org/10.3390/antiox9070594>.
- [296] Sugimoto M, Takagi T, Suzuki R, Konno N, Asama H, Sato Y, et al. Mirogabalin vs pregabalin for chemotherapy-induced peripheral neuropathy in pancreatic cancer patients. *BMC Cancer* 2021;21:1–7.
<https://doi.org/10.1186/s12885-021-09069-9>.
- [297] Sindrup SH, Otto M, Finnerup NB, Jensen TS. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 2005.
https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_96696601.x.
- [298] Perucca E, Yasothan U, Clincke G, Kirkpatrick P. Lacosamide. *Nature Reviews Drug Discovery* 2008;7:973–4.
<https://doi.org/10.1038/nrd2764>.
- [299] Beyreuther BK, Freitag J, Heers C, Krebsfänger N, Scharfenecker U, Stöhr T. Lacosamide: A review of preclinical properties. *CNS Drug Reviews* 2007.
<https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2007.00001.x>.
- [300] Bainbridge J, De Backer M, Eckhardt K, Tennigkeit F, Bongardt S, Sen D, et al. Safety and tolerability of lacosamide monotherapy in the elderly: A subgroup analysis from lacosamide trials in diabetic neuropathic pain. *Epilepsia Open* 2017;2:415–23.
<https://doi.org/10.1002/epi4.12079>.
- [301] Carmland ME, Kreutzfeldt M, Holbech J V., Andersen NT, Jensen TS, Bach FW, et al. Effect of lacosamide in peripheral neuropathic pain: Study protocol for a randomized, placebo-controlled, phenotype-stratified trial. *Trials* 2019;20:588.
<https://doi.org/10.1186/s13063-019-3695-7>.

- [302] Linz K, Christoph T, Tzschentke TM, Koch T, Schiene K, Gautrois M, et al. Cebranopadol: A Novel Potent Analgesic Nociceptin/Orphanin FQ Peptide and Opioid Receptor Agonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2014;349:535–48. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.213694>.
- [303] Christoph T, Raffa R, De Vry J, Schröder W. Synergistic interaction between the agonism of cebranopadol at nociceptin/orphanin FQ and classical opioid receptors in the rat spinal nerve ligation model. *Pharmacology Research and Perspectives* 2018. <https://doi.org/10.1002/prp2.444>.
- [304] Schiene K, Schröder W, Linz K, Frosch S, Tzschentke TM, Christoph T, et al. Inhibition of experimental visceral pain in rodents by cebranopadol. *Behavioural Pharmacology* 2019. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000420>.
- [305] Ruzza C, Holanda VA, Gavioli EC, Trapella C, Calo G. NOP agonist action of cebranopadol counteracts its liability to promote physical dependence. *Peptides (NY)* 2019;112:101–5. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.12.001>.
- [306] Malerba M, Ragnoli B. Ambroxol in the 21st century: pharmacological and clinical update. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4:1119–29. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.8.1119>.
- [307] Hull JD, Lyon RA. In vitro pharmacology of ambroxol: Potential serotonergic sites of action. *Life Sciences* 2018;197:67–72. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.02.002>.
- [308] Liu J, Chen X, Hu Y, Cheng G, Zhong D. Quantification of the major metabolites of bromhexine in human plasma using RRLC-MS/MS and its application to pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.11.024>.
- [309] Helmut Heinrich Buschman. EP1787679A1, 2005.
- [310] Schoenwald RD, Barfknecht CF, Shirolkar S, Xia E, Ignace CC. Identification of Sigma Receptors in Lacrimocytes and their Therapeutic Implication in Dry Eye Syndrome, Springer, Boston, MA; 1994, p. 141–6. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2417-5_24.
- [311] Umezaki Y, Takenoshita M, Toyofuku A. Low-dose aripiprazole for refractory burning mouth syndrome. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2016;12:1229–31. <https://doi.org/10.2147/NDT.S94426>.
- [312] Kasahara S, Kunii Y, Mashiko H, Otani K, Konno S ichi, Niwa S ichi. Four cases of chronic pain that improved dramatically following low-dose aripiprazole administration. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry* 2011;13:27289. <https://doi.org/10.4088/pcc.10l01078>.
- [313] Smaga I, Fierro D, Mesa J, Filip M, Knackstedt LA. Molecular changes evoked by the beta-lactam antibiotic ceftriaxone across rodent models of substance use disorder and neurological disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.05.016>.
- [314] Zhuo M. Ionotropic glutamate receptors contribute to pain transmission and chronic pain. *Neuropharmacology* 2017;112:228–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.014>.
- [315] Hu Y, Li W, Lu L, Cai J, Xian X, Zhang M, et al. An anti-nociceptive role for ceftriaxone in chronic neuropathic pain in rats. *Pain* 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.11.014>.
- [316] Mirzaei V, Manaheji H, Maghsoudi N, Zaringhalam J. Comparison of changes in mRNA expression of spinal glutamate transporters following induction of two neuropathic pain models. *Spinal Cord* 2010. <https://doi.org/10.1038/sc.2010.21>.
- [317] Lorenzoni R, Davies S, Cordenonsi LM, Viçosa JA da S, Mezzomo NJ, de Oliveira AL, et al. Lipid-core nanocapsules containing simvastatin improve the cognitive impairment induced by obesity and hypercholesterolemia in adult rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2020;151:105397. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105397>.
- [318] Koh KK, Sakuma I, Quon MJ. Differential metabolic effects of distinct statins. *Atherosclerosis* 2011. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.10.036>.
- [319] Qiu Y, Chen WY, Wang ZY, Liu F, Wei M, Ma C, et al. Simvastatin Attenuates Neuropathic Pain by Inhibiting the RhoA/LIMK/Cofilin Pathway. *Neurochemical Research* 2016. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1958-1>.
- [320] Hashimoto K, Ishima T. A Novel Target of Action of Minocycline in NGF-Induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells: Translation Initiation Factor eIF4A1. *PLoS ONE* 2010;5:e15430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015430>.
- [321] Soczynska JK, Mansur RB, Brietzke E, Swardfager W, Kennedy SH, Woldeyohannes HO, et al. Novel therapeutic targets in depression: Minocycline as a candidate treatment. *Behavioural Brain Research* 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.026>.
- [322] Ismail CAN, Suppian R, Aziz CBA, Long I. Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathy by

- modulating DREAM and BDNF protein expression in rat spinal cord. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 2019;18:181–90. <https://doi.org/10.1007/s40200-019-00411-4>.
- [323] Shin DA, Kim TU, Chang MC. Minocycline for Controlling Neuropathic Pain: A Systematic Narrative Review of Studies in Humans. *Journal of Pain Research* 2021;Volume 14:139–45. <https://doi.org/10.2147/JPR.S292824>.
- [324] Ushio S, Egashira N, Sada H, Kawashiri T, Shirahama M, Masuguchi K, et al. Goshajinkigan reduces oxaliplatin-induced peripheral neuropathy without affecting anti-tumour efficacy in rodents. *European Journal of Cancer* 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.08.009>.
- [325] Sałat K, Jakubowska A, Kulig K. Cebranopadol: A first-in-class potent analgesic agent with agonistic activity at nociceptin/orphanin FQ and opioid receptors. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2015;24:837–44. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1036985>.
- [326] Hache G, Guiard BP, Nguyen TH, Quesseveur G, Gardier AM, Peters D, et al. Antinociceptive activity of the new triple reuptake inhibitor NS18283 in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain. *European Journal of Pain* 2015;19:322–33. <https://doi.org/10.1002/ejp.550>.
- [327] Schembri E. Are Opioids Effective in Relieving Neuropathic Pain? *SN Comprehensive Clinical Medicine* 2019. <https://doi.org/10.1007/s42399-018-0009-4>.
- [328] Gomes I, Fujita W, Gupta A, Saldanha AS, Negri A, Pinello CE, et al. Identification of a μ - δ opioid receptor heteromer-biased agonist with antinociceptive activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222044110>.
- [329] Eerdeken MH, Kapanadze S, Koch ED, Kralidis G, Volkens G, Ahmedzai SH, et al. Cancer-related chronic pain: Investigation of the novel analgesic drug candidate cebranopadol in a randomized, double-blind, noninferiority trial. *European Journal of Pain (United Kingdom)* 2019. <https://doi.org/10.1002/ejp.1331>.
- [330] Micheli L, Di Cesare Mannelli L, Rizzi A, Guerrini R, Trapella C, Calò G, et al. Intrathecal administration of nociceptin/orphanin FQ receptor agonists in rats: A strategy to relieve chemotherapy-induced neuropathic hypersensitivity. *European Journal of Pharmacology* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.10.005>.
- [331] Ahmadi M, Amiri S, Pecic S, Machaj F, Rosik J, Łos MJ, et al. Pleiotropic effects of statins: A focus on cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165968>.
- [332] Steffens S, Mach F. Anti-inflammatory properties of statins. *Seminars in Vascular Medicine* 2004;4:417–22. <https://doi.org/10.1055/s-2004-869599>.
- [333] Miranda HF, Sierralta F, Aranda N, Poblete P, Castillo RL, Noriega V, et al. Antinociception induced by rosuvastatin in murine neuropathic pain. *Pharmacological Reports* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.11.012>.
- [334] Bhalla S, Singh N, Jaggi AS. Dose-related neuropathic and anti-neuropathic effects of simvastatin in vincristine-induced neuropathic pain in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.016>.
- [335] Sohn HM, Hwang JY, Ryu JH, Kim J, Park S, Park J woo, et al. Simvastatin protects ischemic spinal cord injury from cell death and cytotoxicity through decreasing oxidative stress: In vitro primary cultured rat spinal cord model under oxygen and glucose deprivation-reoxygenation conditions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2017. <https://doi.org/10.1186/s13018-017-0536-9>.
- [336] Abdolmaleki A, Zahri S, Bayrami A. Rosuvastatin enhanced functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *European Journal of Pharmacology* 2020;882:173260. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173260>.
- [337] Li B, Mahmood A, Lu D, Wu H, Xiong Y, Qu C, et al. Simvastatin attenuates microglial cells and astrocyte activation and decreases interleukin-1B level after traumatic brain injury. *Neurosurgery* 2009. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000346272.76537.DC>.
- [338] Tosun T, Gür E, Balci F. Mice plan decision strategies based on previously learned time intervals, locations, and probabilities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518316113>.
- [339] Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 2005;84:214–21. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.07.002>.
- [340] Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2017;10:284. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284>.
- [341] Liu QQ, Yao XX, Gao SH, Li R, Li BJ, Yang W, et al. Role of 5-HT receptors in neuropathic pain: potential therapeutic implications. *Pharmacological Research*

- 2020;159:104949.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104949>.
- [342] Nadeson R, Goodchild CS. Antinociceptive role of 5-HT_{1A} receptors in rat spinal cord. *British Journal of Anaesthesia* 2002. <https://doi.org/10.1093/bja/88.5.679>.
- [343] Haleem DJ. Serotonin-1A receptor dependent modulation of pain and reward for improving therapy of chronic pain. *Pharmacological Research* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.06.030>.
- [344] Haleem DJ. Extending therapeutic use of psychostimulants: Focus on serotonin-1A receptor. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2013. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.07.015>.
- [345] Sousa R, Lakha DR, Brette S, Hitier S. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Assess the Efficacy and Safety of Ambroxol Hard-Boiled Lozenges in Patients with Acute Pharyngitis. *Pulmonary Therapy* 2019. <https://doi.org/10.1007/s41030-019-00100-w>.
- [346] Migdalska-Richards A, Daly L, Bezaud E, Schapira AH V. Ambroxol effects in glucocerebrosidase and α -synuclein transgenic mice. *Annals of Neurology* 2016;80:766–75. <https://doi.org/10.1002/ana.24790>.
- [347] Cazan D, Klimek L, Sperl A, Plomer M, Kölsch S. Safety of ambroxol in the treatment of airway diseases in adult patients. *Expert Opinion on Drug Safety* 2018. <https://doi.org/10.1080/14740338.2018.1533954>.
- [348] Bromhexine: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online n.d. <https://go.drugbank.com/drugs/DB09019> (accessed January 6, 2022).
- [349] Maggio R, Corsini GU. Repurposing the mucolytic cough suppressant and TMPRSS2 protease inhibitor bromhexine for the prevention and management of SARS-CoV-2 infection. *Pharmacological Research* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104837>.
- [350] Shen LW, Mao HJ, Wu YL, Tanaka Y, Zhang W. TMPRSS2: A potential target for treatment of influenza virus and coronavirus infections. *Biochimie* 2017;142:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.07.016>.
- [351] Lam DK, Dang D, Flynn AN, Hardt M, Schmidt BL. TMPRSS2, a novel membrane-anchored mediator in cancer pain. *Pain* 2015. <https://doi.org/10.1097/j.pain.000000000000130>.
- [352] Linciano P, Rossino G, Listro R, Rossi D, Collina S. The sigma-1 receptor antagonists, promising players in fighting neuropathic pain. *Pharmaceutical Patent Analyst* 2020. <https://doi.org/10.4155/ppa-2020-0007>.
- [353] Yamashita T, Yamamoto S, Zhang J, Kometani M, Tomiyama D, Kohno K, et al. Duloxetine inhibits microglial P2X₄ receptor function and alleviates neuropathic pain after peripheral nerve injury. *PLoS ONE* 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165189>.
- [354] Zhou D, Zhuang Y, Chen W, Li W, Miao B. Effects of Duloxetine on the Toll-Like Receptor 4 Signaling Pathway in Spinal Dorsal Horn in a Rat Model of Diabetic Neuropathic Pain. *Pain Medicine* 2018;19:580–8. <https://doi.org/10.1093/pm/pnx125>.
- [355] Tawfik MK, Helmy SA, Badran DI, Zaitone SA. Neuroprotective effect of duloxetine in a mouse model of diabetic neuropathy: Role of glia suppressing mechanisms. *Life Sciences* 2018;205:113–24. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.05.025>.
- [356] Gao Y, Guo X, Han P, Li Q, Yang G, Qu S, et al. Treatment of patients with diabetic peripheral neuropathic pain in China: a double-blind randomised trial of duloxetine vs. placebo. *International Journal of Clinical Practice* 2015;69:957–66. <https://doi.org/10.1111/ijcp.12641>.
- [357] Rodrigues-Amorim D, Olivares JM, Spuch C, Rivera-Baltanás T. A Systematic Review of Efficacy, Safety, and Tolerability of Duloxetine. *Frontiers in Psychiatry* 2020. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.554899>.
- [358] Konno S, Oda N, Ochiai T, Alev L. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of duloxetine monotherapy in Japanese patients with chronic low back pain. *Spine (Phila Pa 1976)* 2016. <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000001707>.
- [359] Salehifar E, Janbabaie G, Hendouei N, Alipour A, Tabrizi N, Avan R. Comparison of the Efficacy and Safety of Pregabalin and Duloxetine in Taxane-Induced Sensory Neuropathy: A Randomized Controlled Trial. *Clinical Drug Investigation* 2020. <https://doi.org/10.1007/s40261-019-00882-6>.
- [360] Matsuoka H, Iwase S, Miyaji T, Kawaguchi T, Ariyoshi K, Oyamada S, et al. Additive Duloxetine for Cancer-Related Neuropathic Pain Nonresponsive or Intolerant to Opioid-Pregabalin Therapy: A Randomized Controlled Trial (JORTC-PAL08). *Journal of Pain and Symptom Management* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2019.06.020>.
- [361] Rodrigues RF, Kawano T, Placido R V., Costa LH, Podestá MHMC, Santos RS, et al. Investigation of the Combination of Pregabalin with Duloxetine or Amitriptyline on the Pharmacokinetics and Antiallodynic Effect During Neuropathic Pain in Rats.

- Pain Physician 2021;E511–20. <https://doi.org/10.36076/ppj.2021.24.E511>.
- [362] Ravinder S, Harbir Kaur R, Thakur Gurjeet S. Comparison of safety and efficacy of pregabalin, duloxetine and their combination with epalrestat in diabetic neuropathy: A prospective, double-blind, randomized, controlled Trial. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2021. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2021.11s108>.
- [363] Chen J, Li L, Chen SR, Chen H, Xie JD, Sirrieh RE, et al. The $\alpha 2\delta$ -1-NMDA Receptor Complex Is Critically Involved in Neuropathic Pain Development and Gabapentin Therapeutic Actions. *Cell Reports* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.021>.
- [364] Li L, Chen SR, Zhou MH, Wang L, Li DP, Chen H, et al. $\alpha 2\delta$ -1 switches the phenotype of synaptic AMPA receptors by physically disrupting heteromeric subunit assembly. *Cell Reports* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109396>.
- [365] Chen Y, Chen SR, Chen H, Zhang J, Pan HL. Increased $\alpha 2\delta$ -1-NMDA receptor coupling potentiates glutamatergic input to spinal dorsal horn neurons in chemotherapy-induced neuropathic pain. *Journal of Neurochemistry* 2019. <https://doi.org/10.1111/jnc.14627>.
- [366] Onakpoya IJ, Thomas ET, Lee JJ, Goldacre B, Heneghan CJ. Benefits and harms of pregabalin in the management of neuropathic pain: A rapid review and meta-analysis of randomised clinical trials. *BMJ Open* 2019. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-023600>.
- [367] Federico CA, Mogil JS, Ramsay T, Fergusson DA, Kimmelman J. A systematic review and meta-analysis of pregabalin preclinical studies. *Pain* 2020. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001749>.
- [368] Moisset X, Pereira B, Bouhassira D, Attal N. Pregabalin: a better neuropathic pain treatment in rodents than in humans. *Pain* 2020. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001993>.
- [369] Wong W, Wallace MS. Determination of the Effective Dose of Pregabalin on Human Experimental Pain Using the Sequential Up-Down Method. *The Journal of Pain* 2014;15:25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.08.011>.
- [370] Weiser T. Comparison of the effects of four Na⁺ channel analgesics on TTX-resistant Na⁺ currents in rat sensory neurons and recombinant Nav1.2 channels. *Neuroscience Letters* 2006;395:179–84. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.10.058>.
- [371] Zhu W, Li T, Silva JR, Chen J. Conservation and divergence in NaChBac and Nav1.7 pharmacology reveals novel drug interaction mechanisms. *Scientific Reports* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67761-5>.
- [372] Leffler A, Reckzeh J, Nau C. Block of sensory neuronal Na⁺ channels by the secretolytic ambroxol is associated with an interaction with local anesthetic binding sites. *European Journal of Pharmacology* 2010;630:19–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.12.027>.
- [373] Weiser T. Ambroxol: A CNS drug? *CNS Neuroscience and Therapeutics* 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2007.00032.x>.
- [374] Severina IS, Bussygina OG, Pyatakova N V., Khropov Y V., Krasnoperov RA. Ambroxol as an inhibitor of nitric oxide-dependent activation of soluble guanylate cyclase. *European Journal of Pharmacology* 2000. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00739-1](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00739-1).
- [375] Sunkari S, Thatikonda S, Pooladanda V, Challa VS, Godugu C. Protective effects of ambroxol in psoriasis like skin inflammation: Exploration of possible mechanisms. *International Immunopharmacology* 2019;71:301–12. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.03.035>.
- [376] Kern K-U, Schwickert-Nieswandt M, Maihöfner C, Gaul C. Topical Ambroxol 20% for the Treatment of Classical Trigeminal Neuralgia - A New Option? Initial Clinical Case Observations. *Headache: The Journal of Head and Face Pain* 2019;59:418–29. <https://doi.org/10.1111/head.13475>.
- [377] Kern K-U, Weiser T. Topical ambroxol for the treatment of neuropathic pain. *Der Schmerz* 2015;29:89–96. <https://doi.org/10.1007/s00482-015-0060-y>.
- [378] Stepanenko YD, Boikov SI, Sibarov DA, Abushik PA, Vanchakova NP, Belinskaia D, et al. Dual action of amitriptyline on NMDA receptors: enhancement of Ca²⁺-dependent desensitization and trapping channel block. *Scientific Reports* 2019;9:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56072-z>.
- [379] Thompson DF, Brooks KG. Systematic review of topical amitriptyline for the treatment of neuropathic pain. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2015;40:496–503. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12297>.
- [380] Sawynok J, Zinger C. Topical amitriptyline and ketamine for post-herpetic neuralgia and other forms of neuropathic pain. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2016. <https://doi.org/10.1517/14656566.2016.1146691>.

- [381] Selvy M, Pereira B, Kerckhove N, Gonneau C, Feydel G, Pétorin C, et al. Long-term prevalence of sensory chemotherapy-induced peripheral neuropathy for 5 years after adjuvant folfox chemotherapy to treat colorectal cancer: A multicenter cross-sectional study. *Journal of Clinical Medicine* 2020. <https://doi.org/10.3390/jcm9082400>.
- [382] Sittl R, Lampert A, Huth T, Schuy ET, Link AS, Fleckenstein J, et al. Anticancer drug oxaliplatin induces acute cooling-aggravated neuropathy via sodium channel subtype Nav1.6-resurgent and persistent current. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012;109:6704–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118058109>.
- [383] Curia G, Biagini G, Perucca E, Avoli M. Lacosamide: A new approach to target voltage-gated sodium currents in epileptic disorders. *CNS Drugs* 2009. <https://doi.org/10.2165/00023210-200923070-00002>.
- [384] Wymer JP, Simpson J, Sen D, Bongardt S. Efficacy and safety of lacosamide in diabetic neuropathic pain: An 18-week double-blind placebo-controlled trial of fixed-dose regimens. *Clinical Journal of Pain* 2009. <https://doi.org/10.1097/AJP.0b013e318196d2b6>.
- [385] Chew LA, Khanna R. CRMP2 and voltage-gated ion channels: potential roles in neuropathic pain. *Neuronal Signaling* 2018. <https://doi.org/10.1042/ns20170220>.
- [386] Moutal A, Luo S, Largent-Milnes TM, Vanderah TW, Khanna R. Cdk5-mediated CRMP2 phosphorylation is necessary and sufficient for peripheral neuropathic pain. *Neurobiology of Pain* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2018.07.003>.
- [387] Liu S, Tang Y, Shu H, Tatum D, Bai Q, Crawford J, et al. Dopamine receptor D2, but not D1, mediates descending dopaminergic pathway-produced analgesic effect in a trigeminal neuropathic pain mouse model. *Pain* 2019;160:334–44. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001414>.
- [388] Gee TA, Weintraub NC, Lu D, Phelps CE, Navratilova E, Heien ML, et al. A pain-induced tonic hypodopaminergic state augments phasic dopamine release in the nucleus accumbens. *Pain* 2020. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001925>.
- [389] Li N, Li C, Han R, Wang Y, Yang M, Wang H, et al. LPM580098, a novel triple reuptake inhibitor of serotonin, noradrenaline, and dopamine, attenuates neuropathic pain. *Frontiers in Pharmacology* 2019. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00053>.
- [390] Martikainen IK, Hagelberg N, Jääskeläinen SK, Hietala J, Pertovaara A. Dopaminergic and serotonergic mechanisms in the modulation of pain: In vivo studies in human brain. *European Journal of Pharmacology* 2018;834:337–45. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.038>.
- [391] Almeida-Santos AF, Ferreira RCM, Duarte ID, Aguiar DC, Romero TRL, Moreira FA. The antipsychotic aripiprazole induces antinociceptive effects: Possible role of peripheral dopamine D2 and serotonin 5-HT1A receptors. *European Journal of Pharmacology* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.053>.
- [392] Preda A, Shapiro BB. A safety evaluation of aripiprazole in the treatment of schizophrenia. *Expert Opinion on Drug Safety* 2020. <https://doi.org/10.1080/14740338.2020.1832990>.
- [393] Uzun Ö, Bolu A. Low-Dose Aripiprazole Augmentation in the Treatment of Burning Mouth Syndrome: A Case Report. *Clinical Neuropharmacology* 2020. <https://doi.org/10.1097/WNF.0000000000000386>.
- [394] Ubuka T. Glutamic acid. *Handbook of Hormones*, Elsevier; 2021, p. 1063–5. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820649-2.00296-5>.
- [395] Gegelashvili G, Bjerrum OJ. Glutamate transport system as a key constituent of glutasome: Molecular pathology and pharmacological modulation in chronic pain. *Neuropharmacology* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.04.029>.
- [396] Bleakman D, Alt A, Nisenbaum ES. Glutamate receptors and pain. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2006. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.10.008>.
- [397] Luo X, Tai WL, Sun L, Pan Z, Xia Z, Chung SK, et al. Crosstalk between astrocytic CXCL12 and microglial CXCR4 contributes to the development of neuropathic pain. *Molecular Pain* 2016. <https://doi.org/10.1177/1744806916636385>.
- [398] Ellis A, Bennett DLH. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *British Journal of Anaesthesia* 2013;111:26–37. <https://doi.org/10.1093/bja/aet128>.
- [399] Cata JP, Weng HR, Dougherty PM. The effects of thalidomide and minocycline on taxol-induced hyperalgesia in rats. *Brain Research* 2008. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.001>.
- [400] Boyette-Davis J, Dougherty PM. Protection against oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia and intraepidermal nerve fiber loss by minocycline. *Experimental Neurology* 2011. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.02.019>.

- [401] Mert T, Sahin E, Yaman S, Sahin M. Pain-Relieving Effectiveness of Co-Treatment with Local Tramadol and Systemic Minocycline in Carrageenan-Induced Inflammatory Pain Model. *Inflammation* 2018;41:1238–49. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0771-1>.
- [402] Yu Z, Liu J, Sun L, Wang Y, Meng H. Combination of Botulinum Toxin and minocycline Ameliorates Neuropathic Pain Through Antioxidant Stress and Anti-Inflammation via Promoting SIRT1 Pathway. *Frontiers in Pharmacology* 2021. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.602417>.
- [403] Raskin J, Pritchett YL, Wang F, D'Souza DN, Waninger AL, Iyengar S, et al. A double-blind, randomized multicenter trial comparing duloxetine with placebo in the management of diabetic peripheral neuropathic pain. *Pain Medicine* 2005;6:346–56. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2005.00061.x>.
- [404] Duloxetine to Prevent Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Patients With Stage II-III Colorectal Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov n.d. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04137107?term=oxaliplatin+prevention&draw=2&rank=21> (accessed December 4, 2020).
- [405] Aghili M, Darzikolaee NM, Babaei M, Ghalehtaki R, Farhan F, Razavi SZE, et al. Duloxetine for the Prevention of Oxaliplatin Induced Peripheral Neuropathy: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-blind Clinical Trial. *Journal of Gastrointestinal Cancer* 2022:1–8. <https://doi.org/10.1007/s12029-022-00824-0>.
- [406] Kato N, Tateishi K, Tsubaki M, Takeda T, Matsumoto M, Tsurushima K, et al. Gabapentin and duloxetine prevent oxaliplatin-and paclitaxel-induced peripheral neuropathy by inhibiting extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Erk1/2) phosphorylation in spinal cords of mice. *Pharmaceuticals* 2021. <https://doi.org/10.3390/ph14010030>.
- [407] Huang KM, Leblanc AF, Uddin ME, Kim JY, Chen M, Eisenmann ED, et al. Neuronal uptake transporters contribute to oxaliplatin neurotoxicity in mice. *Journal of Clinical Investigation* 2020. <https://doi.org/10.1172/JCI136796>.
- [408] Dorsey SG, Kleckner IR, Barton D, Mustian K, O'Mara A, St. Germain D, et al. The National Cancer Institute Clinical Trials Planning Meeting for Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2019;111:531–7. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz011>.
- [409] Mishra A, Chandravanshi LP, Trigun SK, Krishnamurthy S. Ambroxol modulates 6-Hydroxydopamine-induced temporal reduction in Glucocerebrosidase (GCase) enzymatic activity and Parkinson's disease symptoms. *Biochemical Pharmacology* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.028>.
- [410] Bouscary A, Quessada C, René F, Spedding M, Henriques A, Ngo S, et al. Drug repositioning in neurodegeneration: An overview of the use of ambroxol in neurodegenerative diseases. *European Journal of Pharmacology* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173446>.
- [411] Bruna J, Velasco R. Sigma-1 receptor: a new player in neuroprotection against chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Neural Regeneration Research* 2018;13:775. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.232459>.
- [412] Morales-Lázaro SL, González-Ramírez R, Rosenbaum T. Molecular interplay between the sigma-1 receptor, steroids, and ion channels. *Frontiers in Pharmacology* 2019. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00419>.
- [413] Caporoso J, Moses M, Koper K, Tillman TS, Jiang L, Brandon N, et al. A Thermal Place Preference Test for Discovery of Neuropathic Pain Drugs. *ACS Chemical Neuroscience* 2020;11:1006–12. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00013>.
- [414] Boyce-Rustay J, Jarvis M. Neuropathic Pain: Models and Mechanisms. *Current Pharmaceutical Design* 2009;15:1711–6. <https://doi.org/10.2174/138161209788186272>.
- [415] Yin K, Zimmermann K, Vetter I, Lewis RJ. Therapeutic opportunities for targeting cold pain pathways. *Biochemical Pharmacology* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.09.024>.
- [416] Sałat K, Furgała-Wojas A, Awtoniuk M, Sałat R. Wide-range measurement of thermal preference—a novel method for detecting analgesics reducing thermally-evoked pain in mice. *Molecules* 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26030612>.
- [417] Gordon CJ. The mouse thermoregulatory system: Its impact on translating biomedical data to humans. *Physiology and Behavior* 2017;179:55–66. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.05.026>.
- [418] Yezierski RP, Hansson P. Inflammatory and Neuropathic Pain From Bench to Bedside: What Went Wrong? *The Journal of Pain* 2018;19:571–88. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2017.12.261>.
- [419] Sałat K. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy—part 2: focus on the prevention of oxaliplatin-induced neurotoxicity. *Pharmacological Reports* 2020. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00106-1>.

- [420] Safat K, Furgala-Wojas A, Safat R. The microglial activation inhibitor minocycline, used alone and in combination with duloxetine, attenuates pain caused by oxaliplatin in mice. *Molecules* 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26123577>.
- [421] Fillingim RB. Sex, Gender, and Pain. *Principles of Gender-Specific Medicine*, Elsevier; 2017, p. 481–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803506-1.00038-3>.
- [422] Cavallari LH, Johnson JA. A case for genotype-guided pain management. *Pharmacogenomics* 2019;20:705–8. <https://doi.org/10.2217/pgs-2019-0068>.
- [423] Lahousse A, Roose E, Leysen L, Yilmaz ST, Mostaqim K, Reis F, et al. Lifestyle and pain following cancer: State-of-the-art and future directions. *Journal of Clinical Medicine* 2022. <https://doi.org/10.3390/jcm11010195>.
- [424] Anderson SG, Narayanan RP, Malipatil NS, Roberts H, Dunn G, Heald AH. Socioeconomic Deprivation Independently Predicts Painful Diabetic Neuropathy in Type 2 Diabetes. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 2015. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1549966>.
- [425] Ziegler D, Schneider E, Boess FG, Berggren L, Birkelein F. Impact of comorbidities on pharmacotherapy of painful diabetic neuropathy in clinical practice. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2014.04.004>.
- [426] Mogil JS, Chanda ML. The case for the inclusion of female subjects in basic science studies of pain. *Pain* 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.06.020>.
- [427] Sorge RE, Strath LJ. Sex differences in pain responses. *Current Opinion in Physiology* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.05.006>.

11 WYKAZ PUBLIKACJI DOKTORANTA:

1. Latacz, G., Sałat, K., **Furgała-Wojas, A.**, Martyniak, A., Olejarz-Maciej, A., Honkisz-Orzechowska, E., & Szymańska, E. (2022). Phenylalanine-Based AMPA Receptor Antagonist as the Anticonvulsant Agent with Neuroprotective Activity—In Vitro and In Vivo Studies. *Molecules*, 27(3), 875.
2. Sałat, K., **Furgała-Wojas, A.**, & Sałat, R. (2021). The microglial activation inhibitor minocycline, used alone and in combination with duloxetine, attenuates pain caused by oxaliplatin in mice. *Molecules*, 26(12), 3577.
3. Sałat, K., & **Furgała-Wojas, A.** (2021). Serotonergic Neurotransmission System Modulator, Vortioxetine, and Dopaminergic D2/D3 Receptor Agonist, Ropinirole, Attenuate Fibromyalgia-Like Symptoms in Mice. *Molecules*, 26(8), 2398.
4. Stasiłowicz, A., Tykarska, E., Rosiak, N., Sałat, K., **Furgała-Wojas, A.**, Plech, T., ... & Cielecka-Piontek, J. (2021). The Inclusion of Tolfenamic Acid into Cyclodextrins Stimulated by Microenvironmental pH Modification as a Way to Increase the Anti-Migraine Effect. *Journal of Pain Research*, 14, 981.
5. Sałat, K., **Furgała-Wojas, A.**, Awtoniuk, M., & Sałat, R. (2021). Wide-Range Measurement of Thermal Preference—A Novel Method for Detecting Analgesics Reducing Thermally-Evoked Pain in Mice. *Molecules*, 26(3), 612.
6. **Furgała-Wojas, A.**, Kowalska, M., Nowaczyk, A., Fijałkowski, Ł., & Sałat, K. (2020). Comparison of bromhexine and its active metabolite-ambroxol as potential analgesics reducing oxaliplatin-induced neuropathic pain-pharmacodynamic and molecular docking studies. *Current Drug Metabolism*, 21(7), 548-561.
7. Pańczyk, K., Rapacz, A., **Furgała-Wojas, A.**, Sałat, K., Koczurkiewicz-Adamczyk, P., Łucjanek, M., ... & Waszkielewicz, A. (2020). Anticonvulsant and analgesic in neuropathic pain activity in a group of new aminoalkanol derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(16), 127325.
8. Zaręba, P., Gryzłó, B., Malawska, K., Sałat, K., Hoefner, G. C., Nowaczyk, A., Fijałkowski, Ł., Rapacz, A., Podkowa, A., **Furgała, A.**, ... & Kulig, K. (2020). Novel mouse GABA uptake inhibitors with enhanced inhibitory activity toward mGAT3/4 and their effect on pain threshold in mice. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 188, 111920.
9. Sałat, K., **Furgała, A.**, & Malikowska-Racia, N. (2019). Searching for analgesic drug candidates alleviating oxaliplatin-induced cold hypersensitivity in mice. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(6), 1061-1072.
10. Sałat, K., **Furgała, A.**, & Sałat, R. (2019). Interventional and preventive effects of aripiprazole and ceftriaxone used alone or in combination on oxaliplatin-induced tactile and cold allodynia in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 882-890.
11. **Furgała, A.**, Sałat, R., & Sałat, K. (2018). Acute cold allodynia induced by oxaliplatin is attenuated by amitriptyline. *Acta Neurobiol Exp*, 78, 315-321.
12. Paczkowska, M., Mizera, M., Sałat, K., **Furgała, A.**, Popik, P., Knapik-Kowalczyk, J., ... & Cielecka-Piontek, J. (2018). Enhanced pharmacological efficacy of sumatriptan due to modification of its physicochemical properties by

- inclusion in selected cyclodextrins. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
13. Łączkowski, K. Z., Konklewska, N., Biernasiuk, A., Malm, A., Sałat, K., **Furgała, A.**, ... & Paneth, A. (2018). Thiazoles with cyclopropyl fragment as antifungal, anticonvulsant, and anti-Toxoplasma gondii agents: synthesis, toxicity evaluation, and molecular docking study. *Medicinal Chemistry Research*, 27(9), 2125-2140.
 14. **Furgała, A.**, Fijałkowski, Ł., Nowaczyk, A., Sałat, R., & Sałat, K. (2018). Time-shifted co-administration of sub-analgesic doses of ambroxol and pregabalin attenuates oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 930-940.
 15. Pańczyk, K., Pytka, K., Jakubczyk, M., Rapacz, A., Sałat, K., **Furgała, A.**, ... & Waszkielewicz, A. M. (2018). Synthesis and activity of di-or trisubstituted N-(phenoxyalkyl)-or N-{2-[2-(phenoxy) ethoxy] ethyl} piperazine derivatives on the central nervous system. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(11), 2039-2049.
 16. Łączkowski, K. Z., Landowska, K., Biernasiuk, A., Sałat, K., **Furgała, A.**, Plech, T., & Malm, A. (2017). Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel quinuclidinone derivatives as potential antimicrobial and anticonvulsant agents. *Medicinal Chemistry Research*, 26(9), 2088-2104.
 17. Sałat, K., **Furgała, A.**, & Sałat, R. (2018). Evaluation of cebranopadol, a dually acting nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor agonist in mouse models of acute, tonic, and chemotherapy-induced neuropathic pain. *Inflammopharmacology*, 26(2), 361-374.
 18. Sałat, K., Kończakowski, M., **Furgała, A.**, Rojek, A., Śniecikowska, J., Varney, M. A., & Newman-Tancredi, A. (2017). Antinociceptive, antiallodynic and antihyperalgesic effects of the 5-HT_{1A} receptor selective agonist, NLX-112 in mouse models of pain. *Neuropharmacology*, 125, 181-188.
 19. Łączkowski, K. Z., Biernasiuk, A., Baranowska-Łączkowska, A., Zielińska, S., Sałat, K., **Furgała, A.**, ... & Malm, A. (2016). Synthesis, antimicrobial and anticonvulsant screening of small library of tetrahydro-2 H-thiopyran-4-yl based thiazoles and selenazoles. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(sup2), 24-39.
 20. Rybka, S., Obniska, J., Rapacz, A., **Furgała, A.**, Filipek, B., & Żmudzki, P. (2016). Synthesis and evaluation of anticonvulsant properties of new N-Mannich bases derived from 3-(1-phenylethyl)-and 3-benzyl-pyrrolidine-2, 5-dione. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(9), 2147-2151.
 21. Pytka, K., Dziubina, A., Młyniec, K., Dziedziczak, A., Żmudzka, E., **Furgała, A.**, ... & Filipek, B. (2016). The role of glutamatergic, GABA-ergic, and cholinergic receptors in depression and antidepressant-like effect. *Pharmacological Reports*, 68(2), 443-450.
 22. **Furgała, A.**, Sałat, K., & Podkowa, A. (2016). Transportery GABA jako cel terapeutyczny dla nowych leków przeciwbólowych. *Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów Uniwersytetu Jagiellońskiego. Nauki Ścisłe*, (12), 141-156.

23. **Mizera, J., Furgała, A., & Gawlik M.** (2014). Wczesna diagnostyka chorób neurodegeneracyjnych uwarunkowanych przez czynniki środowiskowe o działaniu prooksydacyjnym. *Farmacja Polska*, 70(11): 597-600.