

Dr Katarzyna Starowicz-Bubak
Zakład Farmakologii Bólu
Instytut Farmakologii PAN w Krakowie

AUTOREFERAT

Kraków, 2013

Spis treści

1. Imię i nazwisko *str. 3*
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe *str. 3*
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych *str. 3*
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust.2 z ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.) *str. 4*
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych *str. 22*

1. Imię i nazwisko:

Katarzyna Starowicz-Bubak

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne - z podaniem nazwy miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

Magister Biotechnologii

Data uzyskania tytułu zawodowego: 10.05.2000, Kraków, Polska

Tytuł zawodowy: Magister Biotechnologii Specjalność: Biologia Molekularna (doświadczalna część pracy została wykonana w Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala Biomedical Center, Szwecja)

Doktor nauk medycznych

Studia doktoranckie prowadzone w ramach międzynarodowego programu doktoranckiego wspólnego dla Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN w Warszawie oraz dla Akademii Medycznej Uniwersytetu w Utrechcie. Promotor ze strony polskiej: prof. dr hab. Ryszard Przewłocki; promotor ze strony holenderskiej: prof. Willem Hendrik Gispen.

Data uzyskania stopnia naukowego: 04.04.2005, Utrecht, Holandia. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Evidence for the involvement of MC4 receptors in the central mechanisms of opioid antinociception”.

Zgodnie z ustawą z dn. 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, rozdz. 2 art. 24.1 stopień nadany przez Uniwersytet w Utrechcie jest równoważny ze stopniem naukowym o którym mowa w ustawie.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych:

2000-2004 Asystent w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie

2005-2007 Post-doc w Zespole Endocannabinoid Research Group, Istituto di Chimica Biomolecolare CNR, Pozzuoli we Włoszech

od 2007 Adiunkt w Zakładzie Farmakologii Bólu w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust.2 z ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Przedstawionym do oceny osiągnięciem jest cykl publikacji składający się z 8 prac opublikowanych w latach 2007 – 2013, o łącznym IF równym **42,212** (wg MNiSW: 242 punkty) dotyczący zagadnienia „**Rola receptorów waniloidowych TRPV1 i kanabinoidowych CB1 i ich endogennych ligandów w procesach bólowych**”.

b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

Starowicz K, Maione S, Cristino L, Palazzo E, Marabese I, Rossi F, de Novellis V, Di Marzo V. Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. J Neurosci. 2007;27(50):13739-49. (IF: **7,49**; MNiSW: **24**)

Maione S*, Starowicz K*, Cristino L, Guida F, Palazzo E, Luongo L, Rossi F, Marabese I, de Novellis V, Di Marzo V. Functional interaction between TRPV1 and mu-opioid receptors in the descending antinociceptive pathway activates glutamate transmission and induces analgesia. J Neurophysiol. 2009;101(5):2411-22. **Oznacza autorów z równym wkładem w publikację.* (IF: **3,483**; MNiSW: **24**)

Cristino L, Starowicz K, De Petrocellis L, Morishita J, Ueda N, Guglielmotti V, Di Marzo V. Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. Neuroscience. 2008; 19;151(4):955-68. (IF: **3,556**; MNiSW: **20**)

Starowicz K, Makuch W, Osikowicz M, Pisticelli F, Petrosino S, Di Marzo V, Przewłocka B. Spinal anandamide products analgesia in neuropathic rats: possible CB1- and TRPV1-mediated mechanisms” Neuropharmacology 2012; 62(4):1746-55. (IF: **4,814**; MNiSW: **35**)

Starowicz K, Makuch W, Korostynski M, Malek N, Slezak M, Zychowska M, Petrosino S, De Petrocellis L, Cristino L, Przewłocka B Di Marzo V. Full inhibition of spinal FAAH leads to TRPV1-mediated analgesic effects in neuropathic rats and possible lipoxygenase-mediated remodeling of anandamide metabolism. PLoS One 2013. doi 10.1371/journal.pone.0060040 [Epub ahead of print] (IF: **4,092**; MNiSW: **40**)

De Petrocellis L, Schiano Moriello A, Starowicz K, Di Marzo V. A re-evaluation of 9-HODE activity at TRPV1 channels: enantioselectivity, effects at other TRP channels and potential role in sensory neurons. Br J Pharmacol. 2012;167(8):1643-51. (IF:**4,409**; MNiSW: **30**)

Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. Pharmacol Ther. 2007;114(1):13-33. (IF:**7,968**; MNiSW: **24**)

Starowicz K, Przewłocka B. Suppression of neuropathic pain-related behavior by pharmacological modulation of the spinal endocannabinoid/endovanilloid system, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012;367(1607):3286-99. (IF: 6,4; MNiSW: 45)

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Uwaga: pozycje literatury zaznaczone w tekście pogrubioną czcionką stanowią podstawę osiągnięcia naukowego

Prowadzone przeze mnie badania dotyczą endogennych systemów, które uczestniczą w przekazie informacji bólowej. Wykazanie podobieństwa w budowie chemicznej kapsaicyny, liganda receptora wanilloidowego oraz anandamidu, liganda receptora kanabinoidowego, zapoczątkowało serię badań przedstawiających anandamid jako nowe, cenne narzędzie do leczenia bólu. Związki wykazujące powinowactwo do receptora waniloidowego TRPV1 zwane endowaniloidami (**Starowicz i wsp., 2007b**; Starowicz i wsp., 2008) stanowią niezwykle ciekawą grupą modulatorów procesów nocycyptywnych i mogą być wytwarzane w odpowiedzi na różnorodne bodźce bólowe. W niniejszym omówieniu chciałabym przedstawić moje badania, których celem było określenie roli endowaniloidów, a szczególnie wspólnego zbioru endogennych związków nazwanych też endokanabinoidami w procesach bólowych oraz wskazanie nowych możliwości wykorzystania tych substancji w terapii bólu przewlekłego. Badania te obejmują prace doświadczalne mające na celu opisanie wielu elementów charakteryzujących endowaniloidy oraz ich funkcje. Omówione zostaną takie problemy jak: ekspresja i rozmieszczenie enzymów anabolicznych i katabolicznych anandamidu i innych potencjalnych endowaniloidów w wybranych strukturach ośrodkowego układu nerwowego (OUN) oraz udział anandamidu w przewodnictwie nocycyptywnym i w modulacji przewlekłego bólu (**Cristino i wsp., 2006**; **Starowicz i wsp., 2007a**; **Maione, Starowicz i wsp., 2009**). Omówiona zostanie również charakterystyka działania anandamidu i innych eikozanoidów jako endogennych ligandów receptora TRPV1 w warunkach *in vitro* (**de Petrocellis i wsp., 2012**) a także ocena wpływu egzo- i endogenego anandamidu na przewodnictwo bólowe u zwierząt z bólem neuropatycznym i określenie roli receptorów TRPV1 w obserwowanych efektach analgetycznych w warunkach *in vivo* (**Starowicz i wsp., 2012**; **Starowicz i wsp., 2013**). Powyższe dane eksperymentalne będą podstawą do wskazania nowych możliwości terapii bólu neuropatycznego. Badania obejmują również krytyczny przegląd literatury mający na celu zrozumienie roli endogennych agonistów receptora TRPV1 (**Starowicz i wsp., 2007b**) oraz informacji na temat udziału i możliwych zastosowań endowaniloidów w modulacji bólu neuropatycznego (**Starowicz i Przewłocka, 2012**).

Układ endokanabinodowy

Lecznicze właściwości związków zawartych w *Cannabis sativa* były wykorzystywane od tysięcy lat w leczeniu cierpiących na różne choroby ludzi i zostały opisane już w 2737 r pne w Chinach za panowania dynastii Shen Nung. Jednak szczegółowy opis i odkrycie tego ewolucyjnie „starego” systemu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, tj. układu endokanabinoidowego, zajęło stosunkowo dużo czasu. Pierwszym krokiem w kierunku odkrycia systemu

endokannabinoidowego były prace prof. R. Mechoulam, chemika z Uniwersytetu Hebrajskiego w Jerozolimie, który w 1964 r. wyizolował z *Cannabis sativa* główny psychoaktywny składnik, Δ^9 -tetrahydrokannabinol (Δ^9 -THC) oraz określił jego lipidową strukturę (Goani i Mechoulam, 1964). Kolejne badania prowadzone przez grupę A. Howlett z Uniwersytetu St. Louis opisały wyspecjalizowane miejsca wiążące Δ^9 -THC na powierzchni komórek mózgu (Devane i wsp., 1988), znane dziś jako receptory kanabinoidowe CB₁. Odkrycia te doprowadziły do sklonowania dwóch typów receptorów kanabinoidowych: CB₁ oraz CB₂ (Matsuda i wsp., 1990; Munro i wsp., 1993).

Kolejnym ważnym odkryciem było scharakteryzowanie w 1992 roku (28 lat po zidentyfikowaniu Δ^9 -THC) pierwszego endogennego kanabinoidu, N-arachidonyletanolamidu (anandamidu: od słowa „szczęście” w Sanskrycie) (Devane i wsp., 1992), a nieco później opisanie 2-arachidonylglicerolu (2-AG) jako kolejnego endokannabinoidu (Mechoulam i wsp., 1995). Równie ważnym krokiem było opracowanie narzędzi farmakologicznych modulujących działanie receptora CB₁ oraz wyhodowanie transgenicznych myszy pozbawionych tego receptora. Niezależnie prowadzone badania przez Catherine Ledent z Université Libre de Bruxelles i Andreea Zimmera z Laboratorium Neurobiologii Molekularnej w Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität w Bonn, wykazały, że część efektów Δ^9 -THC została zniesiona u myszy pozbawionych receptora CB₁ (Ledent i wsp., 1999; Zimmer i wsp., 1999).

Endokannabinoidy zarówno chemicznie jak i funkcjonalnie różnią się od Δ^9 -THC. Endogenni agoniści receptorów CB₁ i CB₂ działają jako miejscowe mediatory chemiczne oraz są syntetyzowane z lipidów błonowych „na żądanie” (van der Stelt i wsp., 2005). W odróżnieniu od hormonów lub neuropeptydów endokannabinoidy działają w sposób auto- lub parakryny; nie są magazynowane jak neuroprzekaźniki (są natychmiast metabolizowane); na skutek depolaryzacji i napływu jonów wapnia są uwalniane do przestrzeni synaptycznej; oddziałują na receptory CB₁ w błonie presynaptycznej i hamują uwalnianie neuroprzekaźników z błony presynaptycznej (działają jako neuroprzekaźnik wsteczny: hamują uwalnianie kwasu γ -aminomasłowego, kwasu glutaminowego, noradrenaliny i serotoniny) (Piomelli, 2003). Prekursor fosfolipidowy jest substratem dla obu tych substancji należących do najlepiej poznanych dotychczas endogennych kannabinoidów: anandamidu i 2-AG. W biosyntezie anandamidu bierze udział N-acylofosfatydylo-etanolamino-selektywna fosfolipaza D (NAPE-PLD), w biosyntezie 2-AG: lipaza diacyloglicerolu (DAGL). W inaktywację tych związków zaangażowana jest hydrolaza amidów kwasów tłuszczowych (FAAH dla AEA) lub lipaza monoglicerolowa (dla 2-AG) (Cravatt i wsp., 1996; Giuffrida i wsp., 2001). Podsumowując, układ endokannabinoidowy obejmuje receptory kanabinoidowe (CB₁ i CB₂), ich naturalne ligandy (endokannabinoidy) oraz enzymy związane z ich syntezą, wychwytem i degradacją.

Podobieństwa strukturalne pomiędzy endogennymi ligandami CB₁ i TRPV1: anandamidem i kapsaicyną

Badania korelujące podobieństwa strukturalne pomiędzy kanonicznym ligandem TRPV1 – kapsaicyną – a lipidowymi składnikami układu endokannabinoidowego, w szczególności anandamidu, rozpoczęły nową erę badań, poprzez zasugerowanie istnienia wzajemnych oddziaływań pomiędzy systemem receptorów CB₁ i TRPV1. Receptory kanabinoidowe i receptor TRPV1 zidentyfikowano w ramach badań nad mechanizmem działania dwóch roślinnych produktów naturalnych: psychoaktywnego składnika konopi siewnych (*Cannabis sativa*) – Δ^9 -

THC i drażniącego/piekącego składnika papryki rocznej (*Capsicum annuum*) – kapsaicyny. Receptory te należą do zupełnie różnych rodzin białek – receptory CB₁ i CB₂ są posiadającymi siedem domen transbłonowych receptorami sprzężonymi z białkami G (GPCR) (Howlett, 2005), zaś receptor TRPV1 jest posiadającym sześć domen transbłonowych kanałem kationowym należącym do nadrodziny kanałów TRP, do podrodziny kanałów TRPV (Latorre i wsp., 2007).

Pierwszym dowodem na aktywność endokannabinoidów względem receptora TRPV1 było zidentyfikowanie anandamidu jako liganda TRPV1 (Zygmunt i wsp., 1999). Stwierdzono, że również inny endokannabinoid, N-acylodopamina (NADA), posiada pełną aktywność jako agonista receptora TRPV1 (Huang i wsp., 2002; Chu i wsp., 2003). Najnowsze dane literaturowe wskazują, że ligandy receptorów kanabinoidowych ulegają orto- i/lub allosterycznym oddziaływaniom z innymi receptorami należącymi do rodziny GPCR np. z receptorami sierocymi GPR55, (*de-orphanized receptors*), kanałami jonowymi czy z receptorami aktywowanymi przez czynniki powodujące proliferację peroksyosomów (receptory PPAR) (Pertwee i wsp., 2010; Di Marzo i De Petrocellis, 2012; Kress i Kuner, 2009; Schuelert i McDougall, 2011; Sagar i wsp., 2009). Odkrycie, że anandamid wiąże się nie tylko do receptorów kanabinoidowych, ale również do innych celów, takich jak receptor TRPV1 (Zygmunt i wsp., 1999) było kamieniem milowym w badaniach układu endokannabinoidowego.

Terminem „endokannabinoidy” (Di Marzo i Fontana, 1995) i „endowaniloidy” (Di Marzo i wsp., 2001) definiuje się endogenne substancje agonistyczne odpowiednio do receptorów kanabinoidowych CB₁ i CB₂ oraz receptora TRPV1. Zaproponowano dwa rodzaje endogennych cząsteczek mogących działać w charakterze endokannabinoidów: A) długołańcuchowe amidy kwasów tłuszczowych: N-arachidonoiloetanolamina (anandamid) (Devane i wsp., 1992) i NADA; oraz B) pochodne nieamidowe, w tym: 2-AG i O-arachidonoiloetanolamina (wirodhamina), a także eterowy analog 2-AG, eter noladynowy (Di Marzo i Petrosino, 2007). Również endowaniloidy dzielą się na dwie podrodziny: A) długołańcuchowe amidy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, których najlepiej zbadanymi przedstawicielami są anandamid i N-oleoiloetanolamina, oraz N-acylodopaminy (w tym NADA); a także B) produkty utleniania kwasu arachidonowego takie, jak kwas 12-/ 15-S-hydroperoksy-eikozatetraenoinowe (12-/ 15-S-HPETE) i leukotrien B4 (LTB4) (Starowicz i wsp., 2007b; De Petrocellis i Di Marzo, 2009).

Dystrybucja enzymów anabolicznych i katabolicznych anandamidu i innych potencjalnych endowaniloidów w wybranych strukturach OUN

Pomimo istniejących informacji dotyczących dystrybucji receptora TRPV1, a w szczególności dystrybucji receptora CB₁ w mózgu, niewiele wiadomo o ich potencjalnym współwystępowaniu w strukturach OUN. Większość danych literaturowych ogranicza się do wykazania ekspresji CB₁ i TRPV1 w hodowli neuronów zwojów korzeni grzbietowych DRG (Ahluwalia i wsp., 2000) i neuronów błony mięśniowej jelita (Kulkarni-Narla i Brown, 2001; Coutts i wsp., 2002). Stąd też celem naszych badań było określenie neuroanatomicznych i komórkowych, a zatem funkcjonalnych relacji między systemami kanabinoidowym i waniloidowym w OUN (Cristino i wsp., 2008). Wcześniejsze badania wykazały szczegółowe odwzorowanie immunoreaktywności CB₁/TRPV1 w wybranych strukturach mózgu myszy (Cristino i wsp., 2006).

Niewielkie jest prawdopodobieństwo aby w warunkach fizjologicznych receptor TRPV1 ulegał aktywacji pod wpływem temperatury lub niskiego pH, zasadna wydaje się więc koncepcja sugerująca udział endogennych aktywatorów TRPV1, endowaniloidów (Szallasi i Di Marzo, 2000;

Di Marzo i wsp., 2001; **Starowicz i wsp., 2007b**), w jego aktywacji w neuronach OUN. A zatem endowaniloidy powinny być wytwarzane a następnie uwalniane w sposób zależny od aktywności komórek w których są syntetyzowane w ilościach odpowiednich do wywołania TRPV1-specyficznego reakcji, reakcji porównywalnej z tą wywołaną egzogenną aktywacją receptora TRPV1. Zaś działanie endowaniloidów powinno zostać zakończone w krótkim przedziale czasowym. Z tego względu szlaki biosyntezy i degradacji endowaniloidów powinny znajdować się w bliskim sąsiedztwie receptora TRPV1. Ponieważ miejsce wiązania dla anandamidu (i innych N-acyletanolamin, NAE) znajduje się na wewnątrzkomórkowej domenie TRPV1 (Jordt i Julius, 2002; Gavva i wsp., 2004), można zakładać, że biosynteza endowaniloidów zachodzi wewnątrz tych samych neuronów, które wykazują ekspresję receptora TRPV1. Zbadanie czy komunikacja pomiędzy obydwojema rodzajami receptorów: TRPV1 i CB₁ może mieć czynnościowe znaczenie w przewlekłych zmianach wrażliwości neuronalnej, stanowi podstawę naszych dalszych badań. Pełne zrozumienie działania tego systemu może mieć znaczące konsekwencje – może prowadzić do opracowania nowych metod leczenia bólu, jak również wielu innych problemów zdrowotnych wynikających z zaburzeń w jego funkcjonowaniu (np. lęku, nudności, otyłości, uszkodzeń mózgu).

Anandamid (Zygmunt i wsp., 1999; Smart i wsp., 2000), a następnie inne pochodne długołańcuchowych nienasyconych kwasów tłuszczowych, takich jak N-acyldopaminy (Huang i wsp., 2002; Chu i wsp., 2003), zostały scharakteryzowane jako endogenne aktywatory dla TRPV1 (van der Stelt i Di Marzo, 2004). Wykazano, że NADA, ale już nie jej metabolit O-metylo-NADA, aktywuje receptor TRPV1 w hipokampie (Huang i wsp., 2002). Opisano również endogennych agonistów dla TRPV1 (Hwang i wsp., 2000) wykazując, że produkty niehemowych dioksygenaz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, lipooksygenazy (LOX), aktywują receptor TRPV1 w układzie izolowanych fragmentów błony neuronów czuciowych. Najwyższą aktywność/skuteczność wykazywały monohydroksyepoksy pochodne kwasu arachidonowego (AA): kwas 12-S-HPETE, 15-S-HPETE i LTB₄.

Wymienione powyżej endowaniloidy: anandamid i 12-S-HPETE syntetyzowane są przy udziale enzymów, odpowiednio: NAPE-PLD i 12-LOX (dokładny opis w **Starowicz i wsp., 2007b**). Ponieważ nie zidentyfikowano enzymu/enzymów zaangażowanych w biosyntezę NADA, najbardziej prawdopodobny mechanizm powstawania NADA to proces kondensacji dopaminy (DA) i AA (Huang i wsp., 2002; **Starowicz i wsp., 2007b**). Postulowany jest również mechanizm angażujący N-arachidonoyl-tyrozinę, jednak nie zostało to potwierdzone eksperymentalnie (Hu i wsp., 2004). Główne enzymy zaangażowane w degradację endowaniloidów to FAAH dla anandamidu oraz COMT dla NADA. Inaktywacja 12-S-HPETE może zachodzić na drodze nieenzymatycznej reakcji redukcji, np. przez glutation, do 12-HETE (Canals i wsp., 2003). Mimo istniejącej wiedzy o szlakach enzymatycznych uczestniczących w syntezie endowaniloidów (**Starowicz i wsp., 2007b**), niewiele wiadomo na temat potencjalnej lokalizacji neuronów „endowaniloidoergicznych”, jak również ograniczona jest wiedza na temat istnienia sieci neuronalnych umożliwiających dynamiczne oddziaływanie pomiędzy endowaniloidami a receptorami TRPV1 w strukturach OUN.

Wykonując serię badań immunohistochemicznych, stosując techniki pojedynczego i podwójnego barwienia wykazaliśmy, że niektóre neurony hipokampa oraz neurony kory mózdzku mogą być nazwane neuronami „endowaniloidoergicznymi”, w których to endowaniloidy działają na wzór wewnątrzkomórkowych przekaźników sygnału (**Cristino i wsp., 2008**). W naszych badaniach wykazaliśmy współwystępowanie receptorów TRPV1 z enzymami NAPE-PLD, FAAH, COX-2, 12-LOX i COMT zarówno w neuronach piramidalnych hipokampa w obszarze CA3,

jak i w komórkach Purkiniego. W komórkach Purkiniego występował podobny, choć nie identyczny wzór koekspresji TRPV1 z enzymami NAPE-PLD, FAAH, COX-2 i COMT, neurony te nie wykazywały immunoreaktywności dla enzymu 12-LOX (Cristino i wsp., 2008). Na poziomie komórkowym immunoreaktywność enzymów syntetyzujących i degradujących endowanoloidy zlokalizowana była głównie w somatodendrytycznej części neuronów piramidowych hipokampa obszaru CA3 (z wyjątkiem immunoreaktywności dla 12-LOX) oraz w cytoplaźmie neuronów Purkiniego w mózdku. Nasze obserwacje wskazują na preferencyjną immunoreaktywność FAAH i COX-2 zlokalizowaną w rozgałęzieniach dendrytycznych (Cristino i wsp., 2008). Ponadto wykazaliśmy, że w mózdku immunoreaktywność NAPE-PLD, enzymu syntetyzującego NAE, cechował ziarnisty obraz w całym obszarze warstwy molekularnej, sugerując jego presynaptyczne umiejscowienie w stosunku do kolców dendrytycznych komórek Purkiniego (Cristino i wsp., 2008). Ponadto zidentyfikowaliśmy liczne komórki pozytywne dla COX-2 zarówno w małych, jak i w średnich komórkach warstwy molekularnej oraz w niewielkiej liczbie komórek koszykowych tj. interneuronów GABA-ergicznych kory mózdku (Cristino i wsp., 2008). Nasze badania nie wykazały immunoreaktywności 12-LOX w warstwie komórek Purkiniego kory mózdku, natomiast zarówno warstwa molekularna jak i warstwa ziarnista cechowała się występowaniem licznych komórek wykazujących immunoreaktywność względem 12-LOX (Cristino i wsp., 2008).

Podsumowując, przedstawione wyniki można zinterpretować w następujący sposób: **po pierwsze** w przypadku anandamidu i innych nienasyconych NAE (np. N-oleoyl- oraz N-linoleoyl-etanolamin) ich domniemane miejsce biosyntezy (przy udziale NAPE-PLD) i degradacji (przez FAAH) jak również ich miejsce wiązania z receptorem TRPV1 w polu CA3 rogu Ammona i niektórych komórkach Purkiniego kory mózdku wydaje się być zlokalizowane wewnątrzkomórkowo, wykazuje wysoki poziom koekspresji oraz zlokalizowane jest głównie postsynaptycznie. Na tej podstawie można wnioskować, że endowanoloidy działają jako zależne od jonów wapnia wtórne przekaźniki, które poprzez aktywację TRPV1 zwiększają wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia. Takie działanie jest spójne z efektem aktywacji TRPV1 przez anandamid w neuronach czuciowych DRG (van der Stelt i wsp., 2005). **Po drugie** kolokalizacja 12-LOX i TRPV1 w neuronach piramidalnych pola CA1 i CA3 rogu Ammona wskazuje, że 12-S-HPETE działa jako wewnątrzkomórkowy przekaźnik w neuronach hipokampa, ale nie w neuronach kory mózdku. **Po trzecie**, pomimo, że nie zidentyfikowano dotychczas enzymu (enzymów) zaangażowanych w biosyntezę NADA, nasze badania wskazują, że związek ten jest endogennym ligandem receptora TRPV1, oraz że NADA ulega rozkładowi pod wpływem enzymu COMT, gdyż zarówno w neuronach hipokampa jak i w komórkach Purkiniego wykazaliśmy wysoki poziom koekspresji TRPV1 i COMT. Należy jednak mieć na uwadze, że wzór ekspresji enzymów NAPE-PLD, FAAH, COX-2, 12-LOX i COMT w neuronach innych niż przez nas badane, tj. neuronach, które mogą być neuronami TRPV1-negatywnymi, może również odnosić się do produktów i substratów innych związków biologicznie czynnych, do innych celów molekularnych.

Anandamid i inne eikozanoidy jako endogenne ligandy receptora TRPV1 w warunkach *in vitro*

Napływ jonów wapnia do komórki w stanach związanych z toczącym się stanem zapalnym lub bólem może aktywować lipoksygenazy uczestniczące w procesach utleniania kwasu linoleinowego (Brinckmann i wsp., 1998) prowadząc do powstania kwasu 9- i 13-

hydroksyoctanodekadienowego (9-, 13-HODE). Związki te, od niedawna określone jako endogenne ligandy receptora TRPV1, mogą również powstawać na skutek ekspozycji błony komórkowej na bodźce cieplne, przyczyniając się tym samym do wzmożonej reakcji termicznej receptora TRPV1 (Patwardhan i wsp., 2010). Można zatem przypuszczać, że uszkodzenie tkanek obwodowych prowadzi do wytwarzania ligandów receptora TRPV1. W związku z powyższym, kolejnym celem naszych badań było porównanie efektywności HODE, potencjalnych endogennych ligandów receptora TRPV1, ze znanym związkiem, aktywującym ten receptor – anandamidem oraz jego hydroksylowaną pochodną: 15(S)-hydroksyanandamidem.

W opisywanej pracy (De Petrocellis i wsp., 2012) zbadaliśmy nowo odkryte endogenne ligandy TRPV1, kwas 9-hydroksyoctanodekadienowy (9-HODE) i 13-hydroksyoctanodekadienowy (13-HODE) pod względem ich aktywności wobec receptorów TRPV1 jak również innych receptorów należących do rodziny receptorów TRP i wykazujących wysoki stopień koekspresji z TRPV1: receptora TRPA1 (McMahon i Wood, 2006) oraz receptorów TRPV2 i TRPM8 charakteryzujących się wysokim stopniem ekspresji w neuronach czuciowych. Aktywność wymienionych powyżej typów receptorów TRP, podobnie jak TRPV1, może być modulowana przez kanabinoidy roślinne i endokanabinoidy, zasadne więc było sprawdzenie czy receptory te mogą być nazwane „jonotropowymi receptorami kanabinoidowymi” (De Petrocellis i wsp., 2011; Akopian i wsp., 2009; De Petrocellis i Di Marzo, 2010).

Wykonując pomiary wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia w stabilnie transfekowanych szczurzym i ludzkim TRPV1-cDNA komórkach HEK-293 zbadaliśmy zdolność 9- i 13-HODE do aktywacji receptorów TRP. W doświadczeniach na hodowli komórkowej HEK-293 wykazujących ekspresję poszczególnych receptorów TRP (TRPM8, TRPA1, TRPV2) odpowiedzieliśmy również na pytanie dotyczące selektywności 9- i 13- HODE wobec TRPV1 w porównaniu z wymienionymi typami receptorów TRP. Określiliśmy również selektywność działania 9-S-HODE w hodowli szczurzych neuronów DRG. Uzyskane przez nas wyniki jednoznacznie wskazywały na aktywację TRPV1 zarówno przez 9- jak i 13-HODE, jednak związki te charakteryzowały się mniejszą efektywnością określaną ilością napływu jonów wapnia do komórek w porównaniu z działaniem anandamidu (De Petrocellis i wsp., 2012). Efekty działania anandamidu jak i HODE były antagonizowane przez podanie I-RTX, antagonisty receptora TRPV1. Co więcej nie obserwowano ich w komórkach nietransfekowanych receptorem TRPV1 (De Petrocellis i wsp., 2012). W kolejnych etapach pracy wykazaliśmy, że również produkt metabolizmu anandamidu przez 15-lipooksygenazę (15-LOX), 15(S)-HAEA, wykazuje selektywną aktywność wobec receptora TRPV1.

Dalsza charakterystyka HODE pod względem ich zdolności aktywacji receptora TRPV1 miała na celu zbadanie czy związki te wywołują sensytyzację receptora TRPV1 w sposób podobny do kanonicznego aktywatora receptora TRPV1, kapsaicyny, w stabilnie transfekowanych ludzkim receptorem TRPV1 komórkach HEK293. Wykazaliśmy, że spośród badanych związków tylko 15-hydroksy-anandamidu oraz enancjomer 9-(S)-HODE wywoływały desensytyzację TRPV1. Z uwagi na fakt, że 9-(S)-HODE wykazywał najwyższą aktywność względem receptora TRPV1 w stabilnie transfekowanych komórkach HEK-293, związek ten został przebadany pod kątem zdolności aktywacji receptora TRPV1 w pierwotnych hodowlach neuronów czuciowych DRG.

W przeprowadzonych przez nas badaniach oryginalną była obserwacja, że HODE, w podobny sposób jak roślinne kanabinoidy zdolne aktywować receptor TRPV1, czy jak endokanabinoidy (Di Marzo i De Petrocellis, 2010; De Petrocellis i wsp., 2011), aktywują również TRPA1 i/lub TRPV2 (De Petrocellis i wsp., 2012). Jednakże, w przeciwieństwie do anandamidu,

związki 9 - i 13 -HODE nie wykazywały charakterystycznej selektywności wobec TRPV1, np. 13-HODE wykazywał wyższe powinowactwo do TRPV2 niż do TRPV1. W związku z powyższym nie możemy stwierdzić, że metabolity kwasu linolowego są selektywnymi endowaniloidami.

Podsumowując, na podstawie przedstawionych wyników można wywnioskować, że 9(S)-HODE i 13-HODE najprawdopodobniej nie są odpowiedzialne za efekty wywołane aktywacją TRPV1 m.in. w stanach bólu zapalnego. Bardziej prawdopodobne jest, że odpowiada za nie anandamid lub jego 15-hydroksy pochodna, 15-hydroksy-anandamid. W celu potwierdzenia tych przypuszczeń lub zbadania, czy inne pochodne anandamidu i produkty jego degradacji przez lipooksygenazę pełnią rolę endowaniloidów *in vivo*, konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań.

Rola endowaniloidów w szlakach bólowych

Zainicjowaną w czasie wykonywania pracy doktorskiej tematykę związaną z rozwojem i możliwościami modulacji bólu, kontynuowałam w czasie stażu podoktorskiego. Rezultatem tego okresu pracy są badania wykazujące **po raz pierwszy**, że TRPV1 w toniczny sposób kontroluje aktywność dróg glutaminianergicznych z brzuszno-bocznej Istoty szarej okołowodociągowej (VL-PAG) do brzuszno-bocznego obszaru rdzenia przedłużonego (RVM) równocześnie hamując nocycepcję.

System PAG/RVM sprawuje dwukierunkową kontrolę w procesach przewodnictwa bólowego (Heinricher i wsp., 2009), której neuronalną podstawę można przypisać występowaniu heterogennej populacji komórek w RVM: komórek OFF, które charakteryzują się ustaniem wyładowań elektrycznych podczas odruchów nocyceptywnych, oraz komórek ON, których wyładowania elektryczne ustają nagle tuż przed wystąpieniem odruchów nocyceptywnych. System PAG-RVM jest uznawany za główne miejsce działania wielu leków przeciwbólowych, w tym kanabinoidów (Fields, 2000; Maione i wsp., 2006; Palazzo i wsp., 2012).

Pomimo faktu, że coraz więcej dowodów wykazuje ekspresję TRPV1 w mózgu (Mezey i wsp., 2000; Sanchez i wsp., 2001, Roberts i wsp., 2004; Liapi i Wood, 2005; Toth i wsp., 2005; Cristino i wsp., 2006), dane na temat roli receptora TRPV1 w ponadrdzeniowych mechanizmach kontroli bólu, w tym w obszarach pnia mózgu biorących udział w zstępujących szlakach kontroli bólu, są ograniczone (McGaraughty, 2003; Cristino i wsp., 2006, Maione i wsp., 2007). Dlatego głównym założeniem prezentowanej w obecnym omówieniu pracy (**Starowicz i wsp., 2007a**), było zbadanie wpływu aktywacji lub zablokowania receptora TRPV1 w brzuszno-bocznej części PAG (VL-PAG) na poziom uwalnianych transmiterów istotnych dla procesów modulacji transmisji bólowej tj. aminokwasów pobudzających (glutaminian) i hamujących (kwas γ -aminomasłowy, GABA); na aktywność neuronów OFF i ON w RVM, oraz na wrażliwość na bodźce termiczne. Większość danych wskazujących, że aktywność receptora TRPV1 może mieć wpływ na uwalnianie glutaminianu opiera się na badaniach *in vitro*, natomiast brak jest danych *in vivo*. Nasze badania wykazały, że podanie kapsaicyny (agonisty receptora TRPV1) zwiększało ilość uwalnianego glutaminianu i w niewielkim stopniu GABA oraz zmniejszało nadwrażliwość na bodźce bólowe. Natomiast po podaniu selektywnego antagonisty receptora TRPV1 (I-RTX) obserwowano zmniejszenie ilości uwalnianego glutaminianu i GABA, co korelowało z nasileniem wrażliwości na bodźce bólowe. Ponadto wykazaliśmy, że łączne podanie kapsaicyny z antagonistą receptora TRPV1 znosiło efekty obserwowane po podaniu agonisty, potwierdzając zarazem specyficzność działania kapsaicyny na receptor TRPV1 (**Starowicz i wsp., 2007a**).

W kolejnym etapie badań dokonaliśmy oceny wpływu podań ligandów TRPV1 na aktywność komórek OFF i ON, a następnie odnieśliśmy obserwowane zmiany w intensywności wyładowań elektrycznych neuronów do pomiarów wrażliwości na bodźce termiczne. Zaobserwowaliśmy, że podanie agonisty receptora TRPV1 zwiększając aktywność komórek OFF (równocześnie hamując aktywność komórek ON), powodowało zwiększenie progu wrażliwości na bodźce termiczne. Natomiast podanie antagonisty receptora TRPV1 powodowało nasilenie transmisji bólowej, czyli przejawiało się zwiększeniem aktywności komórek ON i zmniejszeniem aktywności komórek OFF. Łączne podanie agonisty oraz antagonisty receptora TRPV1 znosiło efekty obserwowane po podaniu agonisty, co podobnie jak w pierwszej serii eksperymentów wskazywało na specyficzność efektu wywołanego przez stymulację receptora TRPV1 (**Starowicz i wsp., 2007a**). Zbadaliśmy również ekspresję receptora TRPV1 na neuronach glutaminianergicznym jak i GABA-ergicznym w PAG i RVM. Przy użyciu techniki immunohistochemicznej (podwójna immunofluorescencja) z zastosowaniem markerów dla neuronów glutaminianergicznym jak i GABA-ergicznym zidentyfikowaliśmy neurony TRPV1-pozytywne zarówno w PAG jak i w RVM. Zwróciliśmy uwagę, że zidentyfikowane w PAG neurony wykazujące ekspresję TRPV1 są neuronami glutaminianergicznymi (**Starowicz i wsp., 2007a**). W oparciu o wyniki badań histologicznych można zatem wnioskować, że neurony TRPV1-pozytywne zlokalizowane w PAG na skutek pobudzenia (po podaniu kapsaicyny) uwalniają glutaminian z zakończeń zlokalizowanych w RVM, następstwem czego jest podwyższenie aktywności komórek OFF, odpowiedzialnych za hamowanie przewodzenia bólu w rdzeniu kręgowym. Natomiast po podaniu antagonisty (I-RTX) obserwowano spadek ilości uwalnianego glutaminianu, nasilenie aktywności komórek ON oraz zwiększoną percepcję bodźców bólowych. Na podstawie wyników uzyskanych po łącznych podaniach agonisty oraz antagonisty receptora TRPV1 istotnym wynikiem jest fakt tonicznego wpływu endowanoloidów na zstępujące drogi bólowe.

Jednym z kierunków naszych badań było zrozumienie zależności pomiędzy nowym i ważnym elementem uczestniczącym w przekazie bólu jakim okazały się receptory TRPV1 a jednym z głównych układów antynocyceptywnych tj. systemem opioidowym (**Maione, Starowicz i wsp., 2009**). Opioidy, podobnie jak kanabinoidy, oraz jak wskazują nasze badania endowanoloidy (**Starowicz i wsp., 2007a**), wpływają na aktywność zstępujących dróg modulujących przewodzenie bólu w rdzeniu kręgowym. Obecnie leki opioidowe działające poprzez receptor MOP (*μ -opioid peptide*; receptor opioidowy typu μ) należą wciąż do najsilniej działających leków przeciwbólowych, stosowanych w leczeniu zarówno bólu ostrego, jak i przewlekłego (Przewłocki i Przewłocka, 2001) dlatego celem naszych dalszych badań było określenie funkcjonalnych interakcji pomiędzy receptorami TRPV1 i MOP w strukturach zstępującej transmisji nocyceptywnej tj. VL-PAG i RVM. Dotychczasowe wyniki wskazują negatywne interakcje pomiędzy receptorami TRPV1 a MOP, zarówno w badaniach z zastosowaniem systemów heterologicznej ekspresji jak i w izolowanych neuronach czuciowych. Zarówno Vetter i wsp. (2006) jak i Endres-Becker i wsp. (2007) wykazali, że aktywacja MOP hamuje aktywację TRPV1 poprzez zahamowanie jego sensytyzacji zależnej od cAMP (De Petrocellis i wsp., 2001). Natomiast aktywacja receptora TRPV1 prowadzi do tolerancji receptora MOP, mimo iż wielokrotne podania morfiny powodują wzrost ekspresji TRPV1 w neuronach DRG (Chu i wsp., 2008). Wyniki naszej pracy są pierwszym przykładem pozytywnej/dodatniej interakcji pomiędzy receptorami MOP i TRPV1 (**Maione, Starowicz i wsp., 2009**). Wykazaliśmy, że ligandy MOP, oddziałując na hamujące neurony zlokalizowane w VL-PAG współdziałają z ligandami receptora TRPV1 i prowadzą do wzmożonego uwalniania glutaminianu w RVM,

hamując w ten sposób aktywność (ilość wyładowań elektrycznych) komórek ON i skracając przerwę w aktywności komórek OFF. Obserwowanym behawioralnym efektem interakcji podprogowych dawek ligandów MOP i TRPV1 było zmniejszenie odpowiedzi nocycetywnej na bodziec termiczny. Korelacja wyników uzyskanych z doświadczeń behawioralnych (ocena zachowań bólowych wywołanych bodźcem termicznym) z wynikami mikrodializy i elektrofizjologicznymi pomiarami aktywności neuronów dowiodła, że ligandy receptorów MOP i TRPV1, DAMGO i kapsaicyna, podane w dawkach podprogowych istotnie wpływają na aktywność komórek ON zlokalizowanych w RVM, w sposób zależny zarówno od antagonisty MOP, naloksonu, jak również zależny od antagonisty TRPV1, I-RTX. Z zastosowaniem techniki podwójnej immunofluorescencji wykazaliśmy wysoki poziom immunoreaktywności neuronów TRPV1-pozytywnych w VL-PAG, a pewną ich populację cechowała również obecność MOP. TRPV1 i MOP cechował komplementarny wzór ekspresji: sygnał immunopozytywny dla TRPV1 zlokalizowany był głównie na ciele komórkowym neuronów, podczas gdy MOP głównie na związanej z nimi błonie komórkowej i na włóknach. W mniejszym stopniu obserwowano współwystępowanie MOP/TRPV1 w neuronach RVM. Przedstawione wyniki sugerują, że aktywacja receptora MOP nie tylko uwalnia z hamującej kontroli neurony projekcyjne PAG-RVM ale również poprzez oddziaływanie z receptorem TRPV1 nasila uwalnianie kwasu glutaminowego do RVM. Wyniki naszych badań farmakologicznych, elektrofizjologicznych i mikrodializy wskazują na współdziałanie receptorów MOP i TRPV1 w szlaku PAG-RVM. A zatem wygaszenie aktywności wyładowań komórek ON wraz ze skróceniem czasu pomiędzy kolejnymi wyładowaniami komórek OFF, elementów istotnych w mechanizmie działania zstępujących dróg przewodzenia informacji nocycetywnej do rdzenia kręgowego, wywołuje działanie przeciwbólowe.

Rola receptorów TRPV1 i CB₁ w bólu neuropatycznym

Po zakończeniu stażu podoktorskiego, w październiku 2007 roku zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Farmakologii Bólu IF PAN w Krakowie, kierowanym przez prof. Barbarę Przewłocką, gdzie kontynuuję badania nad rolą receptora TRPV1 w bólu, ze szczególnym uwzględnieniem bólu neuropatycznego. Badania dotyczą dokładniejszego poznania mechanizmów działania endogennych systemów, które hamują przekaz informacji bólowej i które mogłyby zostać wykorzystane w terapii. Innowacyjne podejście do terapii bólu przewlekłego uwzględnia dualistyczną naturę endogennego liganda receptorów TRPV1 i CB₁ - anandamidu. Badania mają na celu dostarczyć nowych informacji na temat udziału i zaangażowania tych systemów w procesy bólu neuropatycznego. Jak wynika ze statystyk Międzynarodowego Towarzystwa Badania Bólu (IASP) oraz jego europejskiego oddziału (EFIC) co piąty Europejczyk cierpi na ból przewlekły, a jednemu na trzech pacjentów stan ten uniemożliwia prowadzenie dotychczasowego i niezależnego stylu życia. Ból neuropatyczny stanowi poważny problem terapeutyczny ze względu na swój przewlekły charakter oraz oporność na leczenie farmakologiczne wynikające m.in. z osłabienia przeciwbólowego działania leków opioidowych przy równoczesnej konieczności stosowania przewlekłej terapii. Pociąga to za sobą wzrost prawdopodobieństwa wystąpienia objawów niepożądanych i schorzeń towarzyszących (np. depresji). Z tego względu zaproponowanie nowego punktu uchwytu dla terapii bólu przewlekłego może, oprócz działań poznawczych, mieć także duże znaczenie społeczne. Badania receptora TRPV1 wskazują na jego znamieny udział w procesach nocycetywnych, natomiast niewiele wiadomo o roli endogennych agonistów tego receptora w rozwoju i utrzymywaniu się bólu neuropatycznego. Celem tej części badań było określenie roli endowaniloidów,

wytwarzanych w odpowiedzi na bodziec bólowy i aktywujących rdzeniowe receptory TRPV1, jak również zbadanie oddziaływania endowanoloidów z receptorami CB₁ w rozwoju i utrzymywaniu się bólu neuropatycznego. Zrozumienie roli endogennych agonistów receptorów TRPV1 i CB₁ pomoże w znalezieniu nowych, skuteczniejszych metod farmakoterapii bólu przewlekłego, opartych na wzmocnieniu działania związków wytwarzanych przez organizm.

W badaniach zmierzających do zrozumienia plastyczności układu nerwowego w odpowiedzi na ból przewlekły używa się modeli zwierzęcych bólu neuropatycznego. Jednym z najczęściej stosowanych modeli obwodowej neuropatii jest model podwiązania nerwu kulszowego (*chronic constriction injury, CCI*) szczegółowo opisany przez Bennett i Xie (1988). W zastosowanym przez nas tym modelu bólu neuropatycznego u szczurów, zaobserwowano, że rozwój charakterystycznych objawów, tj. pojawienie się wrażliwości na bodźce nieuszkodzające (alodynia) oraz zwiększonej wrażliwości na uszkodzające bodźce dotykowe i termiczne (hiperalgezia), następuje już po 2-3 dniach od podwiązania nerwu kulszowego, a zmiany utrzymują się do 28 dni (Przewłocka i wsp., 1999; Starowicz i wsp., 2002; Obara i wsp., 2010).

Wyniki ostatnich badań wskazują, że endowanoloidy działają jako endogenne aktywatory zstępujących antynocyceptywnych szlaków przewodzenia bólu (Starowicz i wsp., 2007a). Tak więc, nie tylko TRPV1, ale również endowanoloidy i enzymy regulujące metabolizm, mogą być obiecującymi punktami uchwytu dla badań farmakologicznych mających na celu opracowanie skutecznych metod leczenia bólu. Dane otrzymane przez naszą grupę badawczą wskazują, że w przeciwbólowych właściwościach egzogennie, a także endogennie podwyższonego poziomu anandamidu w bólu neuropatycznym uczestniczą mechanizmy TRPV1-zależne (Starowicz i wsp., 2012). Wykazaliśmy, że wrażliwość zarówno na bodźce termiczne jak i mechaniczne u zwierząt w tym modelu bólu neuropatycznego jest zależna od aktywacji rdzeniowych receptorów TRPV1. Wyniki przedstawionych badań poszerzają wcześniejsze obserwacje na temat efektów aktywacji receptorów TRPV1, o stwierdzenie, że w warunkach bólu neuropatycznego większą rolę w efektach anandamidu odgrywają receptory TRPV1 niż CB₁, co może być istotnym czynnikiem w rozwoju termicznej hiperalgezji u zwierząt z bólem neuropatycznym. Właściwości te nie wynikają wyłącznie z bezpośredniego działania anandamidu na receptory TRPV1, ponieważ aktywność anandamidu sterowana jest przez jego metabolizm, w którym mogą uczestniczyć również enzymy inne niż FAAH. Na miejscowy metabolizm może również wpływać aktywność receptorów CB₁, a także obecność innych endowanoloidów. Z przeglądu literatury wiadomo, że metabolity lipoksygenacji anandamidu i/lub jego pochodne: oleoyletanolamina (OEA) i palmitoyletanolamina (PEA), które mimo, że nie posiadają działania agonistycznego względem receptorów CB₁ i CB₂ (Sheskin i wsp., 1997; Lambert i wsp., 1999; Griffin i wsp., 2000), w odpowiedzi na anandamid nasilają rozkurcz mięśni gładkich w ścianie naczyń krwionośnych wywołany aktywacją receptorów TRPV1 (Ho i wsp., 2008). Ekspresja TRPV1, CB₁ i FAAH w tych samych komórkach (nieopublikowane wyniki własne; Ahluwalia i wsp., 2002; Binzen i wsp., 2006) tworzy anatomiczną podstawę do modulowania funkcji TRPV1 w oparciu o związki uprzednio uznawane za działające wyłącznie poprzez receptory CB₁.

Po wykazaniu udziału rdzeniowych receptorów TRPV1 w przeciwbólowych efektach egzogennego nardzeniowego podania anandamidu kolejnym etapem badań była ocena wpływu zmian w poziomie endogennego anandamidu w rdzeniu kręgowym na przewodnictwo bólowe u zwierząt z bólem neuropatycznym i określenie roli receptorów TRPV1 w obserwowanych efektach analgetycznych. Badania z zastosowaniem farmakologicznej modulacji poziomu endogennego anandamidu przez zahamowanie jego enzymatycznej hydrolizy wywołane

podaniem inhibitora FAAH, URB597 wykazały jego przeciwbólowe, dawko-zależne działanie w testach wrażliwości termicznej, zarówno na wysoką jak i niską temperaturę. Nasze badania wykazały, że efekt analgetyczny jest zależny od dawki inhibitora FAAH (10 µg vs. 100 µg podane nardzeniowo (i.t.)) oraz, że jest receptorowo-specyficzny i pośredniczą w nim receptory TRPV1 i/lub CB₁ (**Starowicz i wsp., 2012**).

Dostępne dane sugerują, że efekt analgetyczny wywołany zahamowaniem enzymatycznego rozkładu anandamidu w warunkach *in vivo* jest zależny od dawki inhibitora FAAH i pośredniczą w nim receptory TRPV1 i/lub CB₁ (Maione i wsp., 2006). W kolejnej części badań poszerzyliśmy zakres dawek URB597, aby dokładniej określić rolę receptorów TRPV1 w obserwowanych efektach analgetycznych. Efekt URB597 w dawce 200 µg (i.t.) ulegał znacznemu osłabieniu tylko w przypadku zablokowania receptora TRPV1 (**Starowicz i wsp., 2013**). Nasze badania potwierdzają hipotezę dotyczącą roli endogennych ligandów TRPV1 w przeciwdziałaniu alodynii i hiperalgezji w stanach bólu neuropatycznego i sugerują zasadność dalszych badań nad strategiami terapeutycznymi polegającymi na pośredniej modulacji czynności receptorów TRPV1 (**Starowicz i wsp., 2012**).

Dalsze eksperymenty, wykonane we współpracy z grupą kierowaną przez prof. Di Marzo z Neapolu, miały na celu określenie poziomu endogennego anandamidu metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią masową (LC-MS) po farmakologicznej modulacji jego poziomu w rdzeniu kręgowym zwierząt neuropatycznych. W badania określiliśmy również poziom pochodnych anandamidu: OEA – lipidu o strukturze chemicznej podobnej do anandamidu, PEA – nasyconego analogu zarówno OEA jak i anandamidu, jak również 2-AG - estru kwasów tłuszczowych, ze względu na wynikające z behawioralnej części badań przesłanki o możliwym udziale innych endogennych ligandów receptora TRPV1 w przeciwbólowym profilu działania URB597. Poziom endogennego anandamidu w odcinku lędźwiowym rdzenia kręgowego szczurów po podaniu URB597 w dawce 10 µg nie zmieniał się (obserwowano jedynie tendencję do podwyższonego poziomu anandamidu), natomiast wzrastał znamienne w wyniku podania URB597 w dawce 100 µg, podczas gdy poziom innych estrów kwasów tłuszczowych: 2-AG, PEA i OEA nie ulegał zmianie. Zahamowanie degradacji endogennego anandamidu z zastosowaniem wyższej dawki inhibitora enzymu FAAH, URB597 – 200 µg, spowodowało istotne obniżenie poziomu anandamidu oraz wzrost poziomu 2-AG, PEA i OEA w rdzeniu kręgowym (**Starowicz i wsp., 2012; Starowicz i wsp., 2013**).

Podsumowując, wyniki naszych badań farmakologicznych i biochemicznych wskazują na istotną rolę receptora TRPV1 w przeciwbólowych efektach wywołanych przez substancje oddziałujące z systemem endokannabinoidowym w bólu neuropatycznym oraz na udział systemu endowaniloidowego w przewlekłych procesach bólowych na poziomie rdzenia kręgowego (**Starowicz i wsp., 2012; Starowicz i wsp., 2013**). W oparciu o łączną analizę wyników badań behawioralnych, które wykazały efekt przeciwbólowy po farmakologicznej modulacji poziomu endogennego anandamidu (poprzez zahamowanie aktywności głównego enzymu odpowiedzialnego za jego hydrolizę) z wynikami analizy LCMS, gdzie dawka 100 µg URB597 podwyższała a 200 µg URB597 obniżała poziom endogennego anandamidu, można wysunąć hipotezę, iż pełne wyłączenie aktywności enzymu FAAH może uruchamiać mechanizmy kompensacyjne, które aktywują alternatywne ścieżki metabolizmu anandamidu.

Z danych literaturowych wiadomo, że anandamid ulega hydrolizie do kwasu arachidonowego i etanolaminy. Ponadto istnieją również dowody wskazujące na udział cykloksygenazy-2 (COX-2) i lipoksygenaz w metabolizmie anandamidu. Produktem katalizowanej

przez COX-2 i LOX oksygenacji anandamidu są biologicznie czynne związki takie jak hydroperoksy-anandamid i prostamidy. Warto zaznaczyć, że o ile produkty oksygenacji z udziałem COX-2 nie oddziałują z receptorem TRPV1, to produkty lipoksygenacji anandamidu aktywują go (De Petrocellis i wsp., 2009; **De Petrocellis i wsp., 2012**). Potwierdzają to m.in. wyniki pracy Craib i wsp. (2001). Autorzy cytowanej pracy wykazali, że za skurcz mięśni oskrzeli świnki morskiej wywołany podaniem anandamidu odpowiedzialny jest receptor TRPV1, a zjawisko to było osłabiane w obecności inhibitorów LOX sugerując, że efekt działania anandamidu jest wynikiem powstawania jego metabolitów działających jako agoniści receptora TRPV1. Niemniej jednak brak dowodów potwierdzających, że w warunkach *in vivo* produkty lipooksygenacji anandamidu są wytwarzane i że wiążą się do receptora TRPV1 powodując w efekcie mierzalny efekt behawioralny. Tak więc w oparciu o aktualny stan wiedzy i wyniki naszych badań możemy zaproponować, że obserwowany efekt analgetyczny wywołany podaniem URB597 w dawce 200 µg nie jest efektem wywołanym bezpośrednią aktywacją receptorów TRPV1 przez anandamid, ale może być sumarycznym efektem włączenia alternatywnych ścieżek metabolizmu anandamidu. Zgodnie z wysuniętą powyżej hipotezą w sytuacji zahamowania aktywności FAAH dochodzi do aktywacji szlaku lipoksygenacji (z udziałem 12-/15-LOX) i wytwarzania innego/kolejnego endogenego liganda receptora TRPV1, 12-/15-S-HPETE (szczegółowy opis i rycina w **Starowicz i wsp., 2007b**) a dowodem na ten mechanizm jest brak opisanych efektów po zastosowaniu baikaleiny, inhibitora ścieżki lipoksygenacji.

Wyniki analizy LC-MS sugerują, że odmienna regulacja poziomu endogenego anandamidu wywołana zahamowaniem jego hydrolizy w warunkach *in vivo* zależy od użytej dawki inhibitora FAAH dlatego określiliśmy poziom ekspresji mRNA enzymów biorących udział w syntezie (NAPE-PLD) i degradacji anandamidu (FAAH). W badaniach uwzględniliśmy również pomiar poziomu ekspresji mRNA dla enzymu 12-/15-LOX- celem weryfikacji poprawności założeń na temat udziału alternatywnych ścieżek rozkładu anandamidu (na drodze lipoksygenacji). Badania nie wykazały istotnych różnic w poziomie ekspresji mRNA dla NAPE-PLD i FAAH, podczas gdy istotnie wzrastał poziom 5-, 12- i 15-LOX w rdzeniu kręgowym szczurów neuropatycznych w porównaniu do zwierząt kontrolnych (**Starowicz i wsp., 2013**). W eksperymentach z zastosowaniem techniki Western blot wykazaliśmy brak istotnych różnic w poziomie białka dla receptorów TRPV1 i CB1 oraz dla enzymu NAPE-PLD w grzbietowej części rdzenia kręgowego w modelu CCI bólu neuropatycznego. Natomiast analiza densytometryczna dla FAAH wykazała spadek, a dla 12-LOX wzrost poziomu białka (**Starowicz i wsp., 2013**).

W celu identyfikacji neuronów odpowiedzialnych za mechanizm proponowanego udziału alternatywnych dróg metabolizmu anandamidu w przeciwbólowym profilu działania związku URB597 przeprowadziliśmy badania z zastosowaniem potrójnych barwień immunohistochemicznych określających stopień kolokalizacji FAAH, TRPV1 i 15-LOX w rogach grzbietowych rdzenia kręgowego. Wyniki przeprowadzonych badań immunohistochemicznych wykazują immunoreaktywność neuronów rdzeniowych dla TRPV1, FAAH i 15-LOX. Co więcej, pomiary wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia w stabilnie transfekowanych szczurzym TRPV1-cDNA komórkach HEK-293 wskazują na funkcjonalną aktywację TRPV1 przez 15-S-HPETE wywołującą napływ jonów wapnia do komórki (**Starowicz i wsp., 2013**).

Odkrycie i charakterystyka endogennych systemów kanabinoidowego i waniloidowego stwarza nowy kierunek dla rozwoju leków przeciwbólowych opartych na hamowaniu katabolizmu endokanabinoidów, działających na więcej niż jeden cel molekularny. Strategia

omijająca bezpośrednio działanie na receptory CB₁ oraz związane z tym częste występowanie objawów niepożądanych stwarza możliwość bezpieczniejszego przejścia od badań podstawowych do kliniki.

Główne osiągnięcia naukowo-badawcze:

1. Nasze badania udowadniają istnienie neuronów "endowaniloidoergicznych" w neuronach piramidalnych hipokampa w obszarze CA3 oraz w komórkach Purkiniego w mózdzku. Pokazaliśmy, że związki endogennie aktywujące receptor TRPV1, w szczególności anandamid, NADA i 12-S-HPETE mogą działać na wzór wewnątrzkomórkowych przekaźników sygnału i neuromodulatorów. Endowaniloidy mogą być produkowane i/lub ulegać degradacji w tych samych komórkach mózgu myszy, które wyrażają ekspresję receptora TRPV1 (**Cristino i wsp., 2008**).
2. Wyniki analizy LCMS sugerują, że odmienna regulacja poziomu endogenego anandamidu wywołana zahamowaniem jego hydrolizy warunkach *in vivo* zależy od użytej dawki inhibitora FAAH. Dlatego dokładna analiza udziału zarówno klasycznych jak i alternatywnych ścieżek syntezy i degradacji anandamidu powinny być brane pod uwagę w planowaniu kolejnych badań (**Starowicz i wsp., 2012; Starowicz i wsp., 2013**).
3. Nie zaobserwowaliśmy istotnych zmian w poziomie ekspresji genu FAAH, natomiast wykazaliśmy istotny wzrost poziomu 5-, 12- i 15-LOX w rdzeniu kręgowym szczurów neuropatycznych w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Wyniki wstępnych badań immunohistochemicznych wykazują immunoreaktywność neuronów rdzeniowych dla TRPV1, FAAH i 15-LOX (**Starowicz i wsp., 2013**).
4. Wstępne pomiary wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia w stabilnie transfekowanych szczurzym TRPV1-cDNA komórkach HEK-293 wskazują na funkcjonalną aktywację TRPV1 przez 12-/15-S-HPETE wywołującą napływ jonów wapnia do komórki (**Starowicz i wsp., 2013**).
5. Scharakteryzowaliśmy grupę produktów utleniania kwasu linolowego: 9- i 13-hydroksynadtlenków (HODE) jako endogennych agonistów receptora TRPV1 i określiliśmy ich własności w porównaniu z najszerzej opisanym endowaniloidem/endokanabinoidem: anandamidem. Doświadczenia na stabilnie transfekowanych szczurzym lub ludzkim rekombinowanym receptorem TRPV1 komórkach HEK-293 wykazały, że enancjoselektywność i selektywność HODE względem TRPV1 jest niższa niż anandamidu. W związku z powyższym anandamid nadal powinien być rozważany jako najsielektywniej działający endowaniloid (**De Petrocellis i wsp., 2012**).
6. Niewątpliwie ciekawym i niezbadanym dotychczas zagadnieniem wydaje się być udział alternatywnych dróg metabolizmu anandamidu w przeciwbólowym profilu działania związku URB597. Nasza hipoteza dotycząca włączenia alternatywnych ścieżek metabolizmu anandamidu w sytuacji zahamowania aktywności FAAH (głównego enzymu hydrolizującego anandamid), wydaje się być poprawna. Jak wykazaliśmy w badaniach behawioralnych obserwowany efekt analgetyczny wywołany podaniem URB597 w najwyższej stosowanej dawce, nie jest efektem wywołanym bezpośrednią aktywacją receptorów waniloidowych TRPV1 a przedstawia mechanizm o złożonym podłożu (efekt osłabiony w obecności inhibitora ścieżki lipoksygenacji) (**Starowicz i wsp., 2012; Starowicz i wsp., 2013**).

7. Przeprowadziliśmy jedne z pierwszych badań określające rolę receptorów TRPV1 i ich endogennych ligandów w zstępujących szlakach bólowych. Wyniki naszych badań wskazują, obecność receptorów TRPV1 na neuronach glutaminianergicznym w szklaku PAG-RVM, co więcej w RVM znajdują się one w bliskim sąsiedztwie zakończeń GABAergicznym. Zaktywowane neurony TRPV1 zlokalizowane w VL-PAG uwalniają glutaminian w RVM, tym samym aktywując komórki OFF. Zaobserwowaliśmy, że TRPV1 w toniczny sposób kontroluje aktywność dróg glutaminianergicznym w strukturach pnia mózgu: PAG-RVM równocześnie hamując nocycepcję (**Starowicz i wsp., 2007a**).
8. Pochodną doświadczeń nad rolą endowaniloidów w strukturach VL-PAG i RVM było zbadanie interakcji pomiędzy receptorami TRPV1 z jednym z głównym układów zaangażowanym w proces nocycepcji tj. z systemem opioidowym. Pokazaliśmy, że aktywacja receptora opioidowego typu μ nie tylko aktywuje komórki OFF oraz pośrednio (ze współudziałem układu GABA-ergicznym) wywołuje supresję komórek ON, ale również funkcjonalnie oddziałuje z układem receptorowym TRPV1 nasilając zwiększenie uwalniania glutaminianu do RVM. Są to jedne z pierwszym badań wykazujące pozytywną interakcję pomiędzy receptorami MOP i TRPV1 (**Maione, Starowicz i wsp., 2009**).
9. Bardzo ważnym wynikiem prowadzonych przez nas badań jest opisanie nowego, złożonego mechanizmu działania endogennie wytwarzanego anandamidu w przewlekłych stanach bólowych (**Starowicz i wsp., 2013**). Wielokierunkowe działanie anandamidu, w warunkach całkowitej farmakologicznej blokady głównego enzymu zaangażowanego w jego degradację, enzymu FAAH, związane jest z syntezą 15-hydroksy-anandamidu oddziałującego z receptorami TRPV1.

Piśmiennictwo:

- Ahluwalia, J., Rang, H., Nagy, I., 2002. The putative role of vanilloid receptor-like protein-1 in mediating high threshold noxious heat-sensitivity in rat cultured primary sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1483–1489.
- Ahluwalia, J., Urban, L., Capogna, M., Bevan, S., Nagy, I., 2000. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience* 100, 685–688.
- Akopian, A.N., Ruparel, N.B., Jeske, N.A., Patwardhan, A., Hargreaves, K.M., 2009. Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 79–84.
- Bennett, G.J., Xie, Y.K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87–107.
- Binzen, U., Greffrath, W., Hennessy, S., Bausen, M., Saaler-Reinhardt, S., Treede, R.-D., 2006. Co-expression of the voltage-gated potassium channel Kv1.4 with transient receptor potential channels (TRPV1 and TRPV2) and the cannabinoid receptor CB1 in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 142, 527–539.
- Brinckmann, R., Schnurr, K., Heydeck, D., Rosenbach, T., Kolde, G., Kühn, H., 1998. Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme. *Blood* 91, 64–74.
- Canals, S., Casarejos, M.J., De Bernardo, S., Rodríguez-Martín, E., Mena, M.A., 2003. Nitric oxide triggers the toxicity due to glutathione depletion in midbrain cultures through 12-lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 278, 21542–21549.
- Chen, Y., Willcockson, H.H., Valtschanoff, J.G., 2008. Increased expression of CGRP in sensory afferents of arthritic mice - effect of genetic deletion of the vanilloid receptor TRPV1. *Neuropeptides* 42, 551–556.
- Chu, C., Ramamurthy, A., Makriyannis, A., Tius, M.A., 2003a. Synthesis of covalent probes for the radiolabeling of the cannabinoid receptor. *J. Org. Chem.* 68, 55–61.
- Chu, C.J., Huang, S.M., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Ewing, S.A., Miller, J.D., Zipkin, R.E., Daddario, N., Appendino, G., Di Marzo, V., Walker, J.M., 2003b. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J. Biol. Chem.* 278, 13633–13639.
- Coutts, A.A., Irving, A.J., Mackie, K., Pertwee, R.G., Anavi-Goffer, S., 2002. Localisation of cannabinoid CB1 receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. *The Journal of Comparative Neurology* 448,

410–422.

- Craib, S.J., Ellington, H.C., Pertwee, R.G., Ross, R.A., 2001. A possible role of lipoxygenase in the activation of vanilloid receptors by anandamide in the guinea-pig bronchus. *Br. J. Pharmacol.* 134, 30–37.
- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B., 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384, 83–87.
- Cristino, L., De Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., Di Marzo, V., 2006. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139, 1405–1415.
- Cristino, L., Starowicz, K., De Petrocellis, L., Morishita, J., Ueda, N., Guglielmotti, V., Di Marzo, V., 2008. Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neuroscience* 151, 955–968.
- De Petrocellis, L., Deva, R., Mainieri, F., Schaefer, M., Bisogno, T., Ciccoli, R., Ligresti, A., Hill, K., Nigam, S., Appendino, G., Di Marzo, V., 2009. Chemical synthesis, pharmacological characterization, and possible formation in unicellular fungi of 3-hydroxy-anandamide. *J. Lipid Res.* 50, 658–666.
- De Petrocellis, L., Di Marzo, V., 2009. Role of endocannabinoids and endovanilloids in Ca²⁺ signalling. *Cell Calcium* 45, 611–624.
- De Petrocellis, L., Di Marzo, V., 2010. Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *J Neuroimmune Pharmacol* 5, 103–121.
- De Petrocellis, L., Harrison, S., Bisogno, T., Tognetto, M., Brandi, I., Smith, G.D., Creminon, C., Davis, J.B., Geppetti, P., Di Marzo, V., 2001. The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *J. Neurochem.* 77, 1660–1663.
- De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A.S., Allarà, M., Bisogno, T., Petrosino, S., Stott, C.G., Di Marzo, V., 2011. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1479–1494.
- De Petrocellis, L., Schiano Moriello, A., Imperatore, R., Cristino, L., Starowicz, K., Di Marzo, V., 2012. A re-evaluation of 9-HODE activity at TRPV1 channels in comparison with anandamide: enantioselectivity and effects at other TRP channels and in sensory neurons. *Br. J. Pharmacol.* 167, 1643–1651.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., 3rd, Johnson, M.R., Melvin, L.S., Howlett, A.C., 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 34, 605–613.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946–1949.
- Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., 2001. Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 346–349.
- Di Marzo, V., De Petrocellis, L., 2010. Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: A further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. *Curr. Med. Chem.* 17, 1430–1449.
- Di Marzo, V., Fontana, A., 1995. Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: “killing two birds with one stone”. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 53, 1–11.
- Di Marzo, V., Petrosino, S., 2007. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 18, 129–140.
- Di Marzo, V., Walker, M. J., 2004. Studies of the biosynthesis of N-arachidonoyl-dopamine (NADA). 14th Annual Symposium on the Cannabinoids, Burlington, Vermont (pp. 10). International Cannabinoid Research Society.
- Endres-Becker, J., Heppenstall, P.A., Mousa, S.A., Labuz, D., Oksche, A., Schäfer, M., Stein, C., Zöllner, C., 2007. Mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. *Mol. Pharmacol.* 71, 12–18.
- Fields, H.L., 2000. Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. *Prog. Brain Res.* 122, 245–253.
- Gavva, N.R., Kliksky, L., Qu, Y., Shi, L., Tamir, R., Edenson, S., Zhang, T.J., Viswanadhan, V.N., Toth, A., Pearce, L.V., Vanderah, T.W., Porreca, F., Blumberg, P.M., Lile, J., Sun, Y., Wild, K., Louis, J.-C., Treanor, J.J.S., 2004. Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J. Biol. Chem.* 279, 20283–20295.
- Giuffrida, A., Beltramo, M., Piomelli, D., 2001. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 7–14.
- Goani, Y. and Mechoulam, R., 1964. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86, 1646–1647.
- Griffin, G., Tao, Q., Abood, M.E., 2000. Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid

- receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 886–894.
- Heinricher, M.M., Tavares, I., Leith, J.L., Lumb, B.M., 2009. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev* 60, 214–225.
- Ho, W.-S.V., Barrett, D.A., Randall, M.D., 2008. “Entourage” effects of N-palmitoylethanolamide and N-oleoylethanolamide on vasorelaxation to anandamide occur through TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 155, 837–846.
- Howlett, A.C., 2005. Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol* 53–79.
- Huang, S.M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T.J., Krey, J.F., Chu, C.J., Miller, J.D., Davies, S.N., Geppetti, P., Walker, J.M., Di Marzo, V., 2002. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8400–8405.
- Hwang, S.W., Cho, H., Kwak, J., Lee, S.Y., Kang, C.J., Jung, J., Cho, S., Min, K.H., Suh, Y.G., Kim, D., Oh, U., 2000. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6155–6160.
- Jordt, S.-E., Julius, D., 2002. Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell* 108, 421–430.
- Kress, M., Kuner, R., 2009. Mode of action of cannabinoids on nociceptive nerve endings. *Exp Brain Res* 196, 79–88.
- Kulkarni-Narla, A., Brown, D.R., 2001. Opioid, cannabinoid and vanilloid receptor localization on porcine cultured myenteric neurons. *Neurosci. Lett.* 308, 153–156.
- Lambert, D.M., Di Marzo, V., 1999. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr. Med. Chem.* 6, 757–773.
- Latorre, R., Brauchi, S., Orta, G., Zaelzer, C., Vargas, G., 2007. ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* 42, 427–438.
- Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J.F., Beslot, F., Böhme, G.A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B.P., Vassart, G., Fratta, W., Parmentier, M., 1999. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283, 401–404.
- Liapi, A., Wood, J.N., 2005. Extensive co-localization and heteromultimer formation of the vanilloid receptor-like protein TRPV2 and the capsaicin receptor TRPV1 in the adult rat cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci.* 22, 825–834.
- Maione, S., Bisogno, T., De Novellis, V., Palazzo, E., Cristino, L., Valenti, M., Petrosino, S., Guglielmotti, V., Rossi, F., Di Marzo, V., 2006. Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 969–982.
- Maione, S., Starowicz, K., Cristino, L., Guida, F., Palazzo, E., Luongo, L., Rossi, F., Marabese, I., De Novellis, V., Di Marzo, V., 2009. Functional interaction between TRPV1 and mu-opioid receptors in the descending antinociceptive pathway activates glutamate transmission and induces analgesia. *J. Neurophysiol.* 101, 2411–2422.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561–564.
- McMahon, S.B., Wood, J.N., 2006. Increasingly irritable and close to tears: TRPA1 in inflammatory pain. *Cell* 124, 1123–1125.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50, 83–90.
- Mezey, E., Tóth, Z.E., Cortright, D.N., Arzubi, M.K., Krause, J.E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P.M., Szallasi, A., 2000. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3655–3660.
- Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65.
- Obara, I., Gunduz Cinar, O., Starowicz, K., Benyhe, S., Borsodi, A., Przewłocka, B., 2010. Agonist-dependent attenuation of mu-opioid receptor-mediated G-protein activation in the dorsal root ganglia of neuropathic rats. *J Neural Transm* 117, 421–429.
- Palazzo, E., Luongo, L., Bellini, G., Guida, F., Marabese, I., Boccella, S., Rossi, F., Maione, S., De Novellis, V., 2012. Changes in cannabinoid receptor subtype 1 activity and interaction with metabotropic glutamate subtype 5 receptors in the periaqueductal gray-rostral ventromedial medulla pathway in a rodent neuropathic pain model. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11, 148–161.

- Patwardhan, A.M., Akopian, A.N., Ruparel, N.B., Diogenes, A., Weintraub, S.T., Uhlson, C., Murphy, R.C., Hargreaves, K.M., 2010. Heat generates oxidized linoleic acid metabolites that activate TRPV1 and produce pain in rodents. *J. Clin. Invest.* 120, 1617–1626.
- Pertwee, R.G., Howlett, A.C., Abood, M.E., Alexander, S.P.H., Di Marzo, V., Elphick, M.R., Greasley, P.J., Hansen, H.S., Kunos, G., Mackie, K., Mechoulam, R., Ross, R.A., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol. Rev.* 62, 588–631.
- Piomelli, D., 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 873–884.
- Przewłocka, B., Mika, J., Capone, F., Machelska, H., Pavone, F., 1999. Intrathecal oxotremorine affects formalin-induced behavior and spinal nitric oxide synthase immunoreactivity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62, 531–536.
- Przewłocki, R., Przewłocka, B., 2001. Opioids in chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 429, 79–91.
- Roberts, J.C., Davis, J.B., Benham, C.D., 2004. [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Res.* 995, 176–183.
- Sagar, D.R., Gaw, A.G., Okine, B.N., Woodhams, S.G., Wong, A., Kendall, D.A., Chapman, V., 2009. Dynamic regulation of the endocannabinoid system: implications for analgesia. *Mol Pain* 5, 59.
- Sanchez, J.F., Krause, J.E., Cortright, D.N., 2001. The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience* 107, 373–381.
- Schuelert, N., McDougall, J.J., 2011. The abnormal cannabidiol analogue O-1602 reduces nociception in a rat model of acute arthritis via the putative cannabinoid receptor GPR55. *Neurosci. Lett.* 500, 72–76.
- Sheskin, T., Hanus, L., Slager, J., Vogel, Z., Mechoulam, R., 1997. Structural requirements for binding of anandamide-type compounds to the brain cannabinoid receptor. *J. Med. Chem.* 40, 659–667.
- Smart, D., Gunthorpe, M.J., Jerman, J.C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A.I., Chambers, J.K., Randall, A.D., Davis, J.B., 2000. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br. J. Pharmacol.* 129, 227–230.
- Starowicz, K., Cristino, L., Di Marzo, V., 2008. TRPV1 receptors in the central nervous system: potential for previously unforeseen therapeutic applications. *Curr. Pharm. Des.* 14, 42–54.
- Starowicz, K., Maione, S., Cristino, L., Palazzo, E., Marabese, I., Rossi, F., De Novellis, V., Di Marzo, V., 2007a. Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. *J. Neurosci.* 27, 13739–13749.
- Starowicz, K., Makuch, W., Korostynski, M., Malek, N., Slezak, M., Zychowska, M., Petrosino, S., De Petrocellis, L., Cristino, L., Przewłocka, B., Di Marzo, V., 2013. Full inhibition of spinal FAAH leads to TRPV1-mediated analgesic effects in neuropathic rats and possible lipoxygenase-mediated remodeling of anandamide metabolism. *PLoS One*. doi 10.1371/journal.pone.0060040 [Epub ahead of print]
- Starowicz, K., Makuch, W., Osikowicz, M., Piscitelli, F., Petrosino, S., Di Marzo, V., Przewłocka, B., 2012. Spinal anandamide produces analgesia in neuropathic rats: possible CB(1)- and TRPV1-mediated mechanisms. *Neuropharmacology* 62, 1746–1755.
- Starowicz, K., Nigam, S., Di Marzo, V., 2007b. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol. Ther.* 114, 13–33.
- Starowicz, K., Przewłocka, B., 2012. Modulation of neuropathic-pain-related behaviour by the spinal endocannabinoid/endovanilloid system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 367, 3286–3299.
- Starowicz, K., Przewłocki, R., Gispén, W.H., Przewłocka, B., 2002. Modulation of melanocortin-induced changes in spinal nociception by mu-opioid receptor agonist and antagonist in neuropathic rats. *Neuroreport* 13, 2447–2452.
- Szallasi, A., Di Marzo, V., 2000. New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. *Trends Neurosci.* 23, 491–497.
- Tóth, A., Boczán, J., Kedei, N., Lizanecz, E., Bagi, Z., Papp, Z., Edes, I., Csiba, L., Blumberg, P.M., 2005. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 135, 162–168.
- Van Der Stelt, M., Di Marzo, V., 2004. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur. J. Biochem.* 271, 1827–1834.
- Van der Stelt, M., Trevisani, M., Vellani, V., De Petrocellis, L., Schiano Moriello, A., Campi, B., McNaughton, P., Geppetti, P., Di Marzo, V., 2005. Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca²⁺ influx via TRPV1 channels. *EMBO J.* 24, 3026–3037.
- Vetter, I., Wyse, B.D., Monteith, G.R., Roberts-Thomson, S.J., Cabot, P.J., 2006. The mu opioid agonist morphine modulates potentiation of capsaicin-evoked TRPV1 responses through a cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway. *Mol Pain* 2, 22.

Zimmer, A., Zimmer, A.M., Hohmann, A.G., Herkenham, M., Bonner, T.I., 1999. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5780–5785.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sjørgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., Högestätt, E.D., 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452–457.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych):

- **Sumaryczny *impact factor* według listy Journal Citation reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania: 128,494 (666 punktów MNiSW)**
- **Liczba cytowań publikacji według bazy Web of science (WoS): 1041**
- **Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): 18**

Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach:

2007-2009 Grant POWROTY/HOMING FNP, KIEROWNIK

Rola rdzeniowych receptorów waniloidowych TRPV1 w przeciwbólowych efektach anandamidu w modelu bólu neuropatycznego.

Źródło finansowania: Fundacja na rzecz Nauki Polskiej

2007-2010 Grant: N N401 015235, KIEROWNIK

Określenie roli rdzeniowych receptorów waniloidowych i ich endogennych ligandów w farmakologii i terapii bólu neuropatycznego

Źródło finansowania: Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW)

2011-2014 Grant LIDER/29/60/L-2/10/NCBiR/2011, KIEROWNIK

Interakcja pomiędzy endokannabinoidami i endowaniloidami jako nowy cel terapeutyczny w bólu neuropatycznym.

Źródło finansowania: Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR)

2007-2009 Grant N N401 061735, wykonawca

Rola astrocytów w sygnalizacji opioidowej w ośrodkowym układzie nerwowym In vitro i in vivo

Źródło finansowania: Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW), Warszawa, Polska.

2008-2012 Grant: N N405 375937, wykonawca

Modulacja aktywacji mikrogleju w bólu neuropatycznym – nowe eksperymentalne podejście do terapii bólu

Źródło finansowania: projekt w ramach 37 konkursu projektów badawczych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW)

2010-2014 Grant „DEPRESJA - MECHANIZMY – TERAPIA”, wykonawca zdania badawczego 5.4. nt. „Rola gleju w skuteczności leków przeciwdepresyjnych stosowanych w bólu neuropatycznym – poszukiwanie nowych możliwości terapii” grantu kierowanego przez prof. K. Wędzonego w Instytucie Farmakologii, PAN, 01.02.2010 – 31.01.2014.

Źródło finansowania: projekt współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach programu operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013

2002-2006 Grant PBZ-MN-001-/P05/2002, wykonawca

Peripheral antinociceptive action of endomorphins in inflammatory and neuropathic pain-mechanisms and clinical application

Źródło finansowania KBN, polsko-niemiecki projekt badawczy zamawiany w dziedzinie nauk neurologicznych

2001-2005 Grant QLRT-2001-02929, wykonawca

Opioids treatment of chronic pain and inflammation in the locomotor system

Źródło finansowania: Komisja europejska w ramach 5th Framework Programme.

2002-2005 Grant I/78562, wykonawca

The role of endocannabinoids in extinction of aversive memories in mice

Źródło finansowania: Volkswagen Stiftung

Grant ICB/767/06, wykonawca

Elevation of FAA levels and activation of CB/TRPV/prostamide receptors as a new therapeutic strategy

Źródło finansowania: Allergan Sales (CA, USA)

Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową:

1. Stypendium Programu Edukacyjnego SOCRATES (inicjatywa Wspólnoty Europejskiej), Department of Microbiology and Medical Biochemistry, Biomedicalcentre, Uppsala University, osoba przyjmująca: prof. Erik Fries; Uppsala, Szwecja, lipiec 1999 – styczeń 2000
2. 4-letnie stypendium na wykonanie projektu doktorskiego wyłonione na drodze konkursowej w ramach „Utrecht University PhD Programme”, nadane przez Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN w Warszawie; Warszawa, Polska, listopad 2000
3. Stypendium konferencyjne FENS/IBRO przyznawane na drodze konkursowej na sfinansowanie uczestnictwa w letniej szkole nt. Peripheral Nervous System: from biology to disease. Nagrodzono 10 doktorantów z 80 nadesłanych zgłoszeń; Ofir, Portugalia, kwiecień 2003
4. Wyróżnienie dla młodego naukowca na zjeździe Polskiego Towarzystwa Badania Bólu zaproszeniem do wystąpienia w sesji „Neurobiology of pain”; Wrocław, Polska, maj 2003
5. Stypendium konferencyjne L'OREAL na zjeździe European Neurochemistry Society, (nagrodzono 3 uczestników); Warszawa, Polska, maj 2003
6. Stypendium konferencyjne EOC na sfinansowanie uczestnictwa w konferencji European Opioid Conference; Wyszehrad, Węgry, kwiecień 2004
7. Stypendium Polskiej Sieci Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN w Warszawie na krótkoterminowy staż badawczy w laboratorium kierowanym przez prof. Christopha Steina; Berlin, Niemcy, czerwiec 2004

8. Stypendium START Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej „Program START” - stypendium krajowe dla młodych naukowców; Warszawa, Polska, marzec 2005
9. Nagroda za osiągnięcia naukowe na 16-tym zjeździe ICRS (ICRS Scientific achievement award), nagrodzono 8 doktorantów oraz 4 post-doków ze 110 prezentowanych doniesień konferencyjnych; Tihany, Węgry, czerwiec 2006
10. Nagroda za najlepszą prezentację na 17-tym Zjeździe ICRS „Achievement award for outstanding scientific presentation”; Montreal, Kanada, czerwiec 2007
11. Stypendium programu Wspólnoty Europejskiej “Neurotrain - Neuroscience Training in Europe”; Wiedeń, Austria, lipiec 2007
12. Nagroda Polskiego Towarzystwa Badania Układu Nerwowego za poster prezentowany na 8 Międzynarodowym Zjeździe PTBUN, (przyznano 2 nagrody); Kraków, Polska, wrzesień 2007
13. Nagroda programu POWROTY/HOMING Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, programu adresowanego do badaczy powracających z dłuższego zagranicznego pobytu naukowego celem dynamizowania rozwoju ich karier naukowych w kraju; Warszawa, Polska, wrzesień 2007
14. Wyróżnienie plakatu „Role of TRPV1 vanilloid receptor in analgesic effects of cannabinoid CB1 receptor agonist in neuropathic pain” przez Zarząd Główny PTBB podczas IV Sympozjum: „Postępy w leczeniu bólu”; Zakopane, Polska, październik 2009
15. Nagroda za najlepszą pracę przeglądową opublikowaną w kwartalniku PTBB "Ból"; Kraków, Polska, luty 2010
16. Wyróżnienie przez Komitet Naukowy zgłoszenia na Gordon Research Conference i zaproponowanie wykładu w sesji „Endocannabinoids and the Spinal and SupraSpinal Control of Pain” prowadzonej przez prof. Andree Hohmann; Les Diablerets, Szwajcaria, maj 2011
17. Otrzymanie prestiżowego stypendium LIDER przyznanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju; Warszawa, Polska, kwiecień 2011
18. Nagroda za najlepszą prezentację na 22-gim Zjeździe ICRS „Achievement award for outstanding scientific presentation”; Freiburg, Niemcy, lipiec 2012
19. Stypendium habilitacyjne 12-tej edycji konkursu L’Oreal Polska dla Kobiet i Nauki; Warszawa, Polska, listopad 2012
20. Zaproszenie do grona wykładowców XXX Szkoły Zimowej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie „Ból przewlekły, mechanizmy, terapia”
21. Zaproszenie do grona wykładowców 10th European Pain School, letniej szkoły pod patronatem IASP oraz FENS/IBRO dla doktorantów i młodych post-doków, która odbędzie się w czerwcu 2013 roku w Sienie (Włochy)

Ponadto byłem adresatem stypendiów konferencyjnych częściowo finansujących mój udział:

1. W konferencji International Narcotic Research Conference (INRC), Perpignan, Francja, kwiecień 2003
2. W 11-tym Światowym kongresie ds. Bólu (World Congress on Pain), Sydney, Australia, kwiecień 2005
3. W 16-tym Zjeździe International Cannabinoid Research Society (ICRS), Tihany, Węgry, marzec 2006

4. W 17-tym Zjeździe International Cannabinoid Research Society (ICRS), Montreal, Kanada, marzec 2007
5. W European Opioid Conference (EOC), Ferrara, Włochy, marzec 2008
6. W 19-tym Zjeździe International Cannabinoid Research Society (ICRS), Chicago, USA, maj 2009
7. W zjeździe European Federation of IASP Chapters (EFIC), Lizbona, Portugalia, maj 2009
8. W 13-tym Światowym kongresie ds. Bólu (World Congress on Pain); Montreal, Kanada, luty 2010
9. W 20-tym Zjeździe International Cannabinoid Research Society, Lund, Szwecja, lipiec 2010
10. W Gordon Research Conference "Cannabinoid Function in the CNS", Les Diablerets, Szwajcaria, maj 2011

Wygłoszenie referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych:

2002

Melanocortin and CRF receptor antagonists reverse morphine tolerance in rats. 22-25.05.2002: 12th Annual Meeting of the European Neuropeptide Club, Olsztyn, Polska

2003

The role of melanocortins and their receptors in nociception. 6th international congress of the Polish Neuroscience Society, Warszawa, Polska

2004

Modulacja bólu a interakcje pomiędzy melanokortynami i opioidami. V Zjazd Polskiego Towarzystwa Badania Bólu, Wrocław, Polska

Melanocortins in chronic pain. 50 lat Instytutu Farmakologii PAN - Oblicza Krakowskiej Neuropsychofarmakologii: Neurobiologiczne mechanizmy bólu przewlekłego. Kraków, Polska

2007

Tonic endovanilloids facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. 17th Annual Symposium on the Cannabinoids, International Cannabinoid Research Society, St-Sauveur, (Québec), Kanada

Endovanilloids form a network with opioids in PAG-RVM descending pain pathways. 8th International Narcotic Research Conference, Berlin, Niemcy

Endocannabinoid/endovanilloid affect descending nociceptive pathway via both CB1 and TRPV1 receptors and form networks with opioids in the PAG-RVM circuit. VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Badania Bólu, Kraków, Polska

2009

Anandamide-induced analgesia through a spinal TRPV1-dependent mechanism in neuropathic rats. 19th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, St. Charles/Chicago, USA

2010

Anandamide - a dual player at spinal CB1 cannabinoid and vanilloid TRPV1 receptors. European Neuropeptide Club, Pecs, Węgry

Inhibitors of fatty-acid amide hydrolase suppress neuropathic pain symptoms through spinal endocannabinoid/endovanilloid mechanisms - role of lipoxygenases. Centre for Neuroscience, University of Dundee, Wielka Brytania

2011

Anandamide attenuates neuropathic pain symptoms by spinal TRPV1 and CB1 receptor activation, 13th Conference of Hungarian Neuroscience Society, Budapeszt, Węgry

Response of spinal TRPV1 and CB₁ receptors in a rat model of neuropathic pain depends on anandamide concentration, European Winter Conference on Brain Research (EWCBR). Wykład w sesji "Recent advances in understanding of peripheral and spinal nociceptive mechanisms of pathological pain". 12-19.03.2011, Les 2 Alpes, Francja

2012

Regulation of TRPV1 responsiveness to anandamide and other endovanilloid in neuropathic pain. European Winter Conference On Brain Research, Villars Sur Ollon, Szwajcaria

OMDM198, a compound targeting both TRPV1 and fatty acid amide hydrolase: a new pain management strategy in osteoarthritis? 22nd Annual Symposium on the Cannabinoids, International Cannabinoid Research Society, Freiburg, Niemcy

2013

Rola receptorów waniloidowych TRPV1 i kanabinoidowych CB1 i ich endogennych ligandów w procesach bólowych, XXX Szkoła Zimowa Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie „Ból przewlekły, mechanizmy, terapia"

Staż naukowe:

2005-2007 Endocannabinoid Research Group, Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pozzuoli, Włochy, prof. Vincenzo Di Marzo

2005 Rudolf Magnus Institute for Neuroscience, Department of Medical Pharmacology and Anesthesiology, Utrecht University Holandia, prof. Roger Adan i prof. Willem Hendrik Gispen

2004 Berlin Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin, Charite-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Niemcy, prof. Christoph Stein

2001 Rudolf Magnus Institute for Neuroscience, Department of Medical Pharmacology and Anesthesiology, Utrecht University Holandia, prof. Roger Adani prof. Willem Hendrik Gispen

Wykłady monograficzne:

2010

Anandamid: endogenny agonista receptorów kanabinoidowych CB1 i waniloidowych TRPV1- Instytut Farmakologii PAN w Krakowie

2012

Nowa strategia farmakoterapii choroby zwyrodnieniowej stawów: receptory TRPV1 i CB1 jako cele interwencji farmakologicznej. Instytut Farmakologii PAN w Krakowie

Recenzowanie projektów i publikacji:

Byłam recenzentem prac naukowych przesyłanych do czasopism Current Topics in Pharmacology, Pharmacology&Therapeutics, Neuroscience Letters, Eur J Pharmacol oraz Pharmacological Reports.

Byłam również recenzentem grantu National Institute of Academic Anaesthesia (NIAA)

Przebieg pracy przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora:

Studia na kierunku Biotechnologii na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego rozpoczęłam w 1996 roku. Po czwartym roku studiów wyjechałam na półroczne stypendium do Uppsala Biomedical Centre, gdzie prowadziłam eksperymenty, których celem było porównanie składu białkowego frakcji mikrosomalnej z ciężką frakcją retikulum endoplazmatycznego (ER) oraz próby identyfikacji enzymu odpowiedzialnego za trawienie haptoglobiny w ER w liniach komórkowych COS-1, HepG2 oraz w hepatocytach. Studia ukończyłam w 2000 roku, uzyskując dyplom magistra biotechnologii ze specjalnością biologia molekularna. Głównym wynikiem pracy magisterskiej zatytułowanej „Studies on the rapidly sedimenting fraction of the endoplasmic reticulum” było zidentyfikowanie grupy docelowych białek odpowiedzialnych za proces proteolitycznego trawienia haptoglobiny. Metodą wirowania różnicowego wykazaliśmy, że większość aktywności proteolitycznej znajdowała się w błonach ciężkiej frakcji ER, sedymentującej w osóbkach podobnych do mitochondriów (tzw. *The mitochondria-associated ER membrane*). Bezpośrednio po zdaniu egzaminu magisterskiego rozpoczęłam 4-letnie studia doktoranckie w ramach projektu będącego współpracą pomiędzy Akademią Medyczną w Utrechcie (Holandia) a Międzynarodowym Instytutem Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN w Warszawie. Zostałam oddelegowana do pracy w Krakowie i zatrudniona na stanowisku asystenta w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie. Celem moich badań było określenie udziału systemu melanokortynowego w bólu neuropatycznym oraz wzajemnych relacji między systemem melanokortynowym a opioidowym w bólu przewlekłym. Doświadczenia stanowiące podstawę mojej rozprawy doktorskiej były prowadzone w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie w Zespole Neurofarmakologii Molekularnej pod kierownictwem Prof. Ryszarda Przewłockiego we współpracy z prof. Willemem H. Gispenem z Akademii Medycznej w Utrechcie (Holandia). Badania pozwoliły na poznanie udziału systemu melanokortynowego w procesach bólowych, ze szczególnym uwzględnieniem bólu przewlekłego (Starowicz i wsp., 2004) jak również na zbadanie interakcji na poziomie rdzenia kręgowego między systemem melanokortynowym a

opiodowym (Starowicz i wsp., 2002; Starowicz i wsp., 2005). W podsumowaniu, badania wskazały po raz pierwszy obecność receptora MC4 w DRG oraz modulację jego ekspresji pod wpływem uszkodzenia nerwu kulszowego. Fakt zachodzenia tych zmian jedynie po stronie uszkodzenia oraz korelacja ze zmianami efektywności ligandów świadczy o ważnej funkcji melanokortyn i receptora MC4 w rozwoju bólu neuropatycznego. Pracę doktorską zatytułowaną „Evidence for the involvement of MC4 receptors in the central mechanisms of opioid antinociception” obroniłam w 2005 roku na Uniwersytecie w Utrechcie w Holandii.

Przebieg pracy po uzyskaniu stopnia naukowego doktora:

Po uzyskaniu tytułu doktora nauk medycznych na Uniwersytecie w Utrechcie odbyłam staż podoktorski w Institute of Biomolecular Chemistry CNR w Pozzuoli w zespole Endocannabinoid Research Group pod kierownictwem prof. Vincenzo Di Marzo. Kontynuując moje zainteresowanie w obszarze poszukiwania skutecznych substancji w leczeniu bólu zainicjowałam badania nad rolą receptorów wanilloidowych TRPV1 zlokalizowanych w ośrodkowym układzie nerwowym. **Po zakończeniu stażu podoktorskiego**, w październiku 2007 roku zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Farmakologii Bólu IF PAN w Krakowie, kierowanym przez prof. Barbarę Przewłocką, gdzie kontynuuję badania nad rolą układu endowanilloidowego i endokannabinoidowego w procesach bólowych, ze szczególnym uwzględnieniem bólu neuropatycznego, co w znacznym stopniu stanowi podstawę opisanego powyżej osiągnięcia naukowego. Ostatnio **krąg moich zainteresowań został poszerzony** o nowe zagadnienie badawcze dotyczące zwyrodnieniowej choroby stawów (osteoporozyzm, OA). Brak skutecznej terapii dla tego schorzenia stwarza pilną potrzebę zaproponowania nowatorskiego leczenia OA. Można to osiągnąć poprzez lepsze zrozumienie funkcjonalnej interakcji pomiędzy receptorami kanabinoidowymi i wanilloidowymi w trakcie rozwoju i trwania tej choroby. Choć wiodącym podejściem do opracowywania leków jest projektowanie związków selektywnych dla danego celu, związki działające na więcej niż jeden komponent biologiczny mogą wykazywać większą skuteczność niż standardowe związki selektywne. Najnowsza ocena szeregu karbaminianowych i mocznikowych pochodnych piperazyny, doprowadziła do syntezy OMDM-198, nowatorskiego związku o „podwójnym działaniu”, aktywnego zarówno względem FAAH, jak i TRPV1. Badania oceniające potencjalne korzyści wypływające z zastosowania OMDM-198 w patologii stawu kolanowego, będą nie tylko istotne dla terapii, ale też dla zrozumienia mechanizmów prowadzących do przewlekłego bólu u pacjentów z OA.

Katarzyna Starowicz - Pabla
Kraków, 13.03.2013