

ANNA FURGAŁA, KINGA SAŁAT, ADRIAN PODKOWA

(UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI)

TRANSPORTERY GABA JAKO CEL TERAPEUTYCZNY DLA NOWYCH LEKÓW PRZECIWBÓLOWYCH

STRESZCZENIE

Kwas γ -aminomasłowy (GABA) jest głównym neuroprzekaznikiem hamującym w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Bierze on udział w bardzo wielu procesach poznawczych, takich jak zdolność skupienia uwagi i pamięć robocza, natomiast zaburzenia jego przewodnictwa odpowiadają prawdopodobnie za liczne schorzenia i choroby OUN, jak schizofrenia, bezsenność, padaczka i zaburzenia lękowe. Przewodnictwo GABA-ergiczne odgrywa również ważną rolę w procesie czucia bólu. W transporcie GABA szczególną rolę odgrywają specyficzne białka (GAT), które poprzez wychwytywanie z przestrzeni synaptycznej zmniejszają jego stężenie w szczeliny synaptycznej. Dokładny mechanizm inhibitorów GAT w modulacji czucia bólu nie został do tej pory poznany. W prezentowanej pracy skupiliśmy się na możliwości wykorzystania inhibitorów GAT jako potencjalnych leków przeciwbólowych.

SŁOWA KLUCZOWE

kwas γ -aminomasłowy, transportery GABA, GAT, Tiagabina, ból, wychwytywanie GABA

INFORMACJE O AUTORACH

Anna Furgała

Katedra Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

e-mail: furgala.ania@gmail.com

Kinga Sałat

Katedra Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

e-mail: salat.kinga@gmail.com

Adrian Podkowa

Katedra Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

e-mail: wellowezen@gmail.com

DEFINICJA BÓLU I JEGO RODZAJE

Według Międzynarodowej Organizacji Badań nad Bólem (International Association for Study of Pain – IASP) ból jest nieprzyjemnym uczuciem i przeżyciem emocjonalnym związanym z istniejącym lub mogącym wystąpić uszkodzeniem tkanek, a także opisywanym przez chorego w kategoriach takiego uszkodzenia. Ból jest jednym z najczęstszych objawów miejscowego uszkodzenia tkanek. Pomimo że jest odbierany jako negatywne doznanie, ból ostry spełnia pozyteczną rolę ochronną. Jest on najczęstszą przyczyną wizyt u lekarza i jednocześnie jednym z najtrudniejszych problemów w praktyce lekarskiej. Pomimo bardzo dużej ilości dostępnych obecnie leków przeciwbólowych część pacjentów nie jest w stanie pozbyć się nieprzyjemnego uczucia dyskomfortu, co bardzo często prowadzi w takich przypadkach do ograniczenia jakości życia i udętki pacjenta¹.

Uczucie bólu powstaje w momencie, gdy działający na tkanki bodziec mechaniczny, chemiczny, elektryczny lub termiczny przekroczy pewną wartość określaną jako próg bólowy. W następstwie takiego zdarzenia dochodzi zazwyczaj do uszkodzenia tkanek z uwolnieniem mediatorów bólu oraz następczego aferentnego przewodzenia impulsów bólowych. Wytworzenie i wyzwolenie bodźca bólowego, jego dalsze przewodzenie i przetworzenie w obrębie ośrodkowego układu nerwowego definiuje się jako czucie bólu (nocycepcja). Ze względu na patofizjologię i etiologię wyróżnia się głównie trzy rodzaje doznań bólowych:

- fizjologiczny ból z receptorów bólowych (ból nocyceptywny/nocyceptorowy),
- patologiczny ból z receptorów bólowych,
- ból neuropatyczny.

¹ Z. Żylicz, M. Krajnik, *Jak powstaje ból? Neurofizjologia bólu dla początkujących*, „Pol. Med. Paliatywna” 2003, nr 2 (1), s. 49–56.

FIZJOLOGICZNY BÓL RECEPTOROWY

Jest on zwykle powodowany przez czynniki zewnętrzne. Stanowi swego rodzaju sygnał ostrzegawczy dla organizmu w momencie, gdy działający na niego bodziec wykazuje tendencję silnie uszkadzającą. Przewodzony jest włóknami cienkimi zmielinizowanymi, jest krótkotrwały i ograniczony do miejsca działania bodźca, wywołując zazwyczaj natychmiastową, odruchową reakcję obronną, mającą na celu ograniczenie i przeciwdziałanie uszkodzeniu tkanek. Jego natężenie zależy od siły bodźca i towarzyszą mu zwykle objawy wegetatywne, z uczuciem niepokoju i lęku².

PATOFIZJOLOGICZNY BÓL Z RECEPTORÓW BÓLOWYCH

Powstaje w wyniku uszkodzenia tkanek lub też procesu zapalnego. Jest objawem choroby fizycznej lub psychicznej. Ten rodzaj bólu może być również chorobą samą w sobie (np. bóle głowy). Występuje pod postacią bólu spoczynkowego (*resting pain*), hiperalgezji i allodynii. Pojęciem hiperalgezji określa się nadmierną (nasiloną) reakcję czucia bólu w wyniku działania bodźca uszkadzającego. W przypadku, gdy ból wywołują bodźce, które zazwyczaj nie wywołują wrażeń bólowych, można mówić o allodynii³.

BÓL NEUROPATYCZNY

Powstaje w sytuacji, gdy dochodzi do uszkodzenia nerwów w wyniku zmiążdżenia, ucisku, przecięcia, zapalenia czy w przebiegu zaburzeń metabolicznych, a także w wyniku uszkodzenia OUN. W obrębie takich nerwów oraz w ich pobliżu dochodzi do wytworzenia się nowych białek receptorowych i kanałowych, dzięki czemu w okolicy uszkodzonego nerwu generowane są spontaniczne potencjały czynnościowe, określane mianem ekotopowych impulsów nerwowych. W wyniku ciągłej aktywności uszkodzonych nerwów w obrębie ośrodkowego układu nerwowego dochodzi do zmian neuroplastycznych. Ból neuropatyczny stanowi bardzo często najcięższą, przewlekłą postać kliniczną bólu i jednocześnie najslabiej reaguje na leczenie ogólnie dostępnymi lekami przeciwbólowymi. Bóle powstające w wyniku uszkodzenia neuronów ośrodkowych określane są mianem bólów ośrodkowych, których szczególny przypadek stanowią bóle fantomowe po amputacji kończyn, do których dochodzi w wyniku niewystarcza-

² Ibidem; R. Olszanecki, P. Wołkow, J. Jawień, *Farmakologia*, red. R. Korbut, Warszawa 2012.

³ K. Wróbel, A. Wróbel, *Ból – analiza zagadnienia, przegląd piśmiennictwa*, „Eduk. Biol. Śr.” 2015, nr 2, s. 20–26.

jącego (lub braku) dopływu bodźców aferentnych, co prowadzi do nieprawidłowej pobudliwości i aktywności neuronów tylnego rogu rdzenia kręgowego⁴.

Częstość występowania bólu fantomowego po amputacji kończyny jest bardzo zróżnicowana i wynosi od 4 do 88%. Zależy ona między innymi od przyjętego stopnia nasilenia bólu jako wartości granicznej oraz od czasu, jaki upłynął od amputacji. Mała skuteczność leczenia farmakologicznego jest częstym powodem sięgania po inne metody leczenia, szczególnie fizjoterapeutyczne i psychoterapeutyczne. Mimo braku dowodów skuteczności często stosowaną techniką psychoterapeutyczną w bólu fantomowym jest hipnoza⁵.

DROGI PRZEWODZENIA BÓLU

Impulsy nerwowe pochodzące z nocyceptorów znajdujących się w skórze, mięśniach i stawach przewodzone są włóknami niezmielinizowanymi typu C oraz włóknami zmielinizowanymi typu A δ w kierunku rdzenia kręgowego. Z kolei przewodzenie impulsów bólowych pochodzących z okolicy trzewnej w głównej mierze odbywa się włóknami C.

Aferentne włókna nerwowe kończą swoją drogę w obrębie rogów tylnych rdzenia kręgowego, gdzie uwalniane są następnie neurotransmitery pronocyceptywne: substancja P oraz aminokwas pobudzający – kwas glutaminowy. Glutaminian wykazuje zdolność do pobudzenia: jonotropowych receptorów NMDA (N-metylo-D-asparagianu), jonotropowych receptortorów AMPA i kainianowych oraz metabotropowych receptorów glutaminianergicznych.

Z rogu tylnego rdzenia kręgowego informacja jest przekazywana bezpośrednio przez neuron wstawkowy na następny neuron, którego akson ulega skrzyżowaniu i podąża do góry pod postacią drogi rdzeniowo-wzgórzowej, gdzie następnie w okolicy jąder bocznych wzgórza seria impulsów trafia do sensorycznych pól projekcyjnych kory mózgowej. Wraz ze wzgórzem stanowi ona główne miejsce świadomego odbierania wrażeń bólowych, głównie jeżeli chodzi o lokalizację i ocenę nasilenia odbieranych bodźców. W reakcjach emocjonalnych, które są wyzwalane przez ból, uczestniczy układ limbiczny, natomiast wegetatywne reakcje towarzyszące bólowi są sterowane przez podwzgórze⁶.

⁴ D. Karpowicz-Kulesza, *Ból neuropatyczny i korzeniowy – czyli zespoły bólowe neurogenne*, „Post. Psychiatr. Neurol.” 1998, No. 7, s. 61–67.

⁵ M. Suchorzewski, M. Wujtewicz, *Opioidy w leczeniu bólu neuropatycznego*, „Pol. Med. Paliatywna” 2007, nr 1 (2), s. 49–53; K. Kwiatkowski, J. Mika, *Rola chemokin w bólu neuropatycznym*, „Ból” 2014, nr 15 (1), s. 19–35; R. Olszanecki, P. Wołkow, J. Jawień, op. cit.

⁶ Ibidem.

ENDOGENNY UKŁAD HAMOWANIA BÓLU

Oprócz układu wstępującego, przynoszącego impulsy bólowe z miejsca, gdzie powstają, do ośrodkowego układu nerwowego, istnieje również tak zwany zstępujący układ hamujący ból (układ antynocyceptywny), którego włókna nerwowe pochodzą z różnych poziomów ośrodkowego układu nerwowego. Zadaniem tego układu jest osłabienie odczuwania bólu poprzez przetwarzanie impulsów bólowych. Endogenne peptydy opioidowe stymulują receptory opioidowe, powodując aktywację tego układu i tym samym prowadząc do znacznej redukcji odczuwania bólu. Jest to szczególnie ważny układ, ponieważ odpowiada za nieodczuwanie bólu w sytuacjach stresowych⁷.

Charakterystyczną właściwością tego układu jest zdolność pobudzania receptorów opioidowych dzięki produkowanym endogennie substancjom, do których zaliczyć można:

- β -endorfinę,
- dynorfinę,
- pentapeptydy metionino- i leucyno-enkefalinowe⁸.

Złożoność ludzkiego organizmu, w tym jego zdolność odczuwania bólu, doprowadziła do odkrycia wielu leków przeciwbólowych, działających na różnych etapach przewodnictwa bólowego. W przypadkach bólu opornego na leczenie, na przykład bólu będącego wynikiem różnego typu neuropatii, gdy dochodzi do zmian neurobiologicznych i strukturalnych w neuronach, standardowe leki przeciwbólowe są niewystarczające i zbyt słabe. Stwarza to potrzebę poszukiwania nowych struktur chemicznych oddziałujących na nowe cele terapeutyczne w obrębie dróg przewodzenia bólu. W tym kontekście istotną rolę wydaje się spełniać układ GABA-ergiczny.

UKŁAD GABA-ERGICZNY

Kwas γ -aminomasłowy (*gamma-aminobutyric acid* – GABA) jest głównym neurotransmiterem hamującym znajdującym się w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Szerokie wykorzystanie tego aminokwasu w znamiennej ilości procesów toczących się w naszym organizmie powoduje wpływ zaburzeń tego układu na

⁷ B. F. Kania, M. Juniak, *Endogenne peptydy opioidowe a ból trzewny*, „Życie Wet.” 2010, nr 85 (3), s. 223–226.

⁸ A. Calignano, G. La Rana, A. Giuffrida, D. Piomelli, *Control of Pain Initiation by Endogenous Cannabinoids*, “Nature” 1998, No. 394, s. 277–281.

liczne schorzenia. Dysfunkcja układu GABA-ergicznego bierze udział w takich schorzeniach, jak: zaburzenia pamięci, zaburzenia siły mięśniowej i pracy mięśni, stres, lęk, depresja, bezsenność, napady drgawkowe i padaczka. Zaburzenia neuroprzekątnictwa GABA-ergicznego mogą potęgować doznania bólowe. W ostatnich latach układ ten był przedmiotem licznych badań, mających na celu określenie mechanizmu i zakresu działania nowych związków, które wykazywały zdolność łączenia się i pobudzania receptorów GABA-ergiczych, jak również oddziaływały z innymi punktami uchwytu, prowadząc do wzmocnienia transmisji GABA-ergiczej⁹.

TRANSPORTERY GABA

Bardzo obiecującym celem terapeutycznym wydają się białka transportujące odpowiedzialne za wychwyt zwrotny GABA. Wychwyt zwrotny GABA z przestrzeni synaptycznej zachodzi dzięki białkom wychwytyjącym GABA zlokalizowanym w błonie komórkowej, tak zwanym GABA transporterom (*GABA transporters*, GAT). Do tej pory zidentyfikowano pięć różnych transporterów, przy czym cztery z nich są transporterami błonowymi zlokalizowanymi w błonie presynaptycznej (GAT 1–4), natomiast piąty (*vesicular transporter*, VGAT) zaliczany jest do transporterów pęcherzykowych, odpowiedzialnych za magazynowanie neuroprzekaznika w części presynaptycznej¹⁰.

Białka te są zaliczane do grupy białek transportujących monoaminy i aminokwasy (m.in. tauryna, glicyna, betaina). Można je podzielić na cztery główne grupy¹¹:

- transportujące aminy biogenne: noradrenalinę, serotoninę, dopaminę,
- różne transportery GABA, w tym transportujące taurynę i keratynę,
- transportery dla proliny i glicyny,
- tzw. sieroce transportery¹².

Poszczególne transportery różnią się między sobą właściwościami i powinowactwem do GABA. Najsilniejsze powinowactwo, wahające się w granicach 0,7 μ M, wykazuje transporter GAT-4, natomiast w przypadku GAT-1 i GAT-3

⁹ S. J. Enna, *The GABA Receptors*, "Adv. Pharmacol." 2006, Vol. 54.

¹⁰ L. A. Borden, *GABA Transporter Heterogeneity: Pharmacology and Cellular Localization*, "Neurochem. Int." 1996, No. 29 (4), s. 335–356.

¹¹ K. Sałat, K. Kulig, *GABA Transporters as Targets for New Drugs*, "Future Med. Chem." 2011, No. 3 (2), s. 211–222.

¹² B. J. Sadock, V. A. Sadock, *Kaplan and Sadock's Consise Textbook of Clinical Psychiatry*, 3rd Edition, Philadelphia 2008.

wartość ta wynosi odpowiednio 7 i 18 μM . Dlatego też określa się je mianem transporterów o wysokim powinowactwie (*high-affinity GABA transporters*), natomiast w przypadku GAT-2, którego powinowactwo wynosi 79 μM , zdolność łączenia się i wychwytu GABA jest niska (*low-affinity GABA transporter*)¹³.

Najbardziej rozpowszechnionymi w obrębie ośrodkowego układu nerwowego transporterami są GAT-1 oraz GAT-4, przy czym GAT-4 zlokalizowany jest głównie na astocytach, które w swoim sąsiedztwie mają zakończenia nerwowe wraz z uwalnianym GABA. Lokalizacja GAT-1 ogranicza się do presynaptycznej błony neuronów GABA-ergicznych. Ze względu na dominującą ilość GAT-1 i GAT-4 uznawane są za kluczowe białka biorące udział w regulacji transmisji GABA-ergicznej. GAT-2 i GAT-3 są znacznie mniej liczne w obrębie OUN, jednak występują również w licznych tkankach obwodowych (wątroba, nerki).

Wspólną cechą wszystkich poznanych transporterów GAT jest przynależność do rodziny transporterów SLC6, które kodowane są przez różne geny: GAT-1 (SLC6A1), GAT-2 (SLC6A12), GAT-3 (SLC6A13) oraz GAT-4 (SLC6A11). Transport GABA przez błonę zachodzi w sposób ściśle sprzężony z Na^+/Cl^- współtransportem, dlatego też białka te określane są mianem Na^+/Cl^- zależnych transporterów. GAT-1, GAT-3 oraz GAT-4, aby przenieść przez błonę jedną cząsteczkę GABA, wymagają obecności dwóch jonów Na^+ i jednego Cl^- do wymiany w mechanizmie ko-transportu na drugą stronę błony, natomiast w przypadku GAT-2 na jedną cząsteczkę GABA potrzeba aż trzech jonów Na^+ i dwóch Cl^- ¹⁴. Transport przez GAT zależy również od stężenia jonów H^+ , które są kluczowymi jonami w pompie protonowej (H^+ ATP-azie). Dzięki nim możliwa jest hydroliza ATP poprzez zakwaszenie wewnętrznej części pęcherzyka. Tworzy się wtedy gradient protonów generujący aktywność transportera. W ten sposób transport wymaga do prawidłowego działania hydrolizy ATP, która generując energię, umożliwia przesunięcie neurotransmitera wbrew gradientowi stężeń. Wewnątrz energia następnie jest utylizowana przez pompę Na^+/K^+ -ATP-azę¹⁵.

Struktura tych transporterów jest nie do końca poznana. Przypuszcza się, że zbudowane są z 12 α -helikalnych błonowych domen, z których każda składa się

¹³ C. G. S. Smith et al., *GABA Transporter Type 1 (GAT-1) Uptake Inhibition Reduces Stimulated Aspartate and Glutamate Release in the Dorsal Spinal Cord In Vivo Via Different GABAergic Mechanisms*, "Neuropharmacol." 2007, No. 53 (8), s. 975–981; A. Podkowa et al., *Pharmacological Activity of Novel GABA Re-uptake Inhibitors in Mice*, "Junio" 2014, No. 26 (1), s. 32–40.

¹⁴ Y. Xu et al., *Hypoalgesia in Mice Lacking GABA Transporter Subtype 1*, "Neurosci. Res." 2008, No. 86 (2), s. 465–470.

¹⁵ P. Kowalczyk et al., *2-Substituted 4-hydroxybutanamides as Potential Inhibitors of γ -Aminobutyric Acid Transporters mGAT1–mGAT4: Synthesis and Biological Evaluation*, "Bio-org. Med. Chem." 2013, No. 21 (17), s. 5145–5167.

z około 20 hydrofobowych aminokwasów. Duża zewnątrzkomórkowa pętla pomiędzy transbłonową domeną 3 i 4 z potencjalnym miejscem N-glikozylacji oraz N- i C-końcowe domeny zawierają miejsce fosforylacji, które usytuowane jest po wewnątrzkomórkowej stronie transportera¹⁶. Struktura pęcherzykowych białek transportujących (VGAT) jest podobna, jednak w porównaniu z GAT 1–4 można zaobserwować charakterystyczne różnice molekularne. W przypadku VGAT pętla, na której zlokalizowane jest miejsce N-glikozylacji, znajdują się pomiędzy 2 i 3 domeną i jest zwrócona w stronę światła pęcherzyka, natomiast dość krótkie odcinki N- i C-końcowe zwrócone są na zewnątrz pęcherzyka magazynującego GABA¹⁷.

MECHANIZM DZIAŁANIA GAT

Aktywność biologiczna GAT-ów modulowana jest przez niektóre endogenne substancje (takie jak: estrogeny, serotonina, noradrenalina, acetylocholina i kwas glutaminowy) i egzogenne (na przykład leki przeciwdrgawkowe i przeciwdepresyjne). Aktywność i funkcjonowanie GAT-1 regulowane jest przez kilka szlaków sygnalizacyjnych, w skład których wchodzi kinazy i fosfatazy jako jedna z bezpośrednich możliwości interakcji z białkami synaptycznymi¹⁸.

Wykazano, że aktywacja kinazy C może wynikać z aktywacji fosfolipazy C i prowadzić do tworzenia się diacyloglicerolu, co zmniejsza ilość transporterów GAT-1. BDNF, czyli neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego, wykazuje zdolność modulowania w hipokampie przewodnictwa GABA-ergicznego zarówno poprzez pre-, jak i postsynaptyczne mechanizmy. Działając za pośrednictwem kaskady sygnalizacyjnej składającej się z TrkB i fosfolipazy C γ , hamuje GAT-1, wydłużając czas działania GABA w szczelinie synaptycznej¹⁹.

UKŁAD GABA-ERGICZNY A CZUCIE BÓLU

Obecność GABA w obrębie synaptycznych zakończeń rdzeniowo-wzgórzowych neuronów wyjściowych, które należą do populacji neuronów wewnętrznych i włókien doprowadzających, pierwotnie kończących się w obrębie rogu grzbie-

¹⁶ W. Soudijn, I. van Wijngaarden, *The GABA Transporter and Its Inhibitors*, "Curr. Med. Chem." 2000, No. 7 (10), s. 1063–1079; A. Lajtha, *Handbook of Neurochemistry and Molecular Biology*, "Neural Membranes and Transport" 2007.

¹⁷ K. Sałat, K. Kulig, *GABA Transporters as Targets for New Drugs*, op. cit.

¹⁸ N. O. Dalby, *Inhibition of γ -aminobutyric Acid Uptake: Anatomy, Physiology and Effects Against Epileptic Seizures*, "Eur. J. Pharmacol." 2003, No. 479 (1–3), s. 127–137; L. Iversen, *Neurotransmitter Transporters and their Impact on the Development of Psychopharmacology*, "Br. J. Pharmacol." 2006, No. 147 (1), s. 82–88.

¹⁹ K. Sałat, K. Kulig, *GABA Transporters as Targets for New Drugs*, op. cit.

towego rdzenia kręgowego, wykazała bardzo istotną rolę GABA-ergiczej transmisji w przekaznictwie hamującym odczuwanie bólu na tym odcinku dróg percepcyjnych. Wykazano, że stymulacja zarówno receptorów GABA_A, jak i GABA_B w grzbietowej części rdzenia kręgowego powoduje działanie znieczulające u gryzoni i naczelnych w modelu bólu ostrego. Modulacja pronocyceptywna, polegająca na stymulacji uwalniania neuroprzekazników, może stanowić istotny krok w poszukiwaniu nowych związków o aktywności przeciwbólowej. Badania na zwierzętach potwierdziły istotną rolę w procesie powstawania bólu (nocycepcji) uwalnianych w obrębie rdzenia aminokwasów pobudzających (EAA), takich jak kwas asparaginowy (ASP) i glutaminian (GLU). Aktywacja receptorów pobudzanych przez EAA w obrębie kręgosłupa wywołuje zwiększone reakcje odczuwania bólu, natomiast blokada tych receptorów poprzez szkodliwą stymulację zmniejsza odczuwanie wrażeń bólowych²⁰. Dalsze poszerzone badania mikrodializy rdzenia kręgowego wykazały, że szkodliwa stymulacja obwodowa może wywołać uwalnianie ASP i GLU²¹.

WPLYW EAA NA NOCYCEPCJĘ

Uwalniania EAA w obrębie rdzenia kręgowego podlega hamującej kontroli i wykazano, że zmniejsza się pod wpływem działania analgetyków opioidowych w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Jednak poważne skutki uboczne i brak odpowiedniej solidności działania wobec bólu przewlekłego tej klasy związków generuje potrzebę poszukiwania nowych leków o aktywności przeciwbólowej. Alternatywne mechanizmy mające na celu hamowanie uwalniania i modulacji transmisji EAA w obrębie rdzenia mogą posłużyć jako potencjalne miejsca uchwytu nowych leków o aktywności przeciwbólowej. Nasilenie hamującej aktywności GABA w obrębie grzbietowej części rdzenia kręgowego poprzez hamowanie wychwytu zwrotnego tego kwasu może wzmacniać efekt przeciwbólowy antagonistów aminokwasów pobudzających bez wystąpienia potencjalnie ograniczających efektów ubocznych związanych bezpośrednio z aktywacją receptora GABA²².

²⁰ S. T. Meller, C. Dykstra, G. F. Gebhart, *Acute Mechanical Hyperalgesia in the Rat Can Be Produced by Coactivation of Spinal Ionotropic AMPA and metabotropic glutamate receptors, activation of phospholipase A2 and generation of Cyclooxygenase Products*, "Prog. Brain Res." 1995, No. 110, s. 177–192; M. E. Fundytus, *Glutamate Receptors and Nociception: Implications for the Drug Treatment of Pain*, "CNS Drugs." 2001, No. 15, s. 29–58.

²¹ A. Ipponi et al., *Tiagabine Antinociception in Rodents Depends on GABA(B) Receptor Activation: Parallel Antinociception Testing and Medial Thalamus GABA Microdialysis*, "Eur. J. Pharmacol." 1999, No. 368 (2–3), s. 205–211.

²² C. G. S. Smith et al., op. cit.

INHIBITORY WYCHWYTU ZWROTNEGO GABA

Od momentu odkrycia GABA i poznania roli przekężnictwa GABA-ergicznego w OUN GAT zostały uznane za interesujący cel terapeutyczny dla związków, które byłyby ich inhibitorami. Jednak terapeutyczny potencjał hamowania GAT został potwierdzony tylko poprzez odkrycie selektywnego inhibitora GAT-1, którym jest tiagabina. Związek ten na szeroką skalę wykorzystywany jest obecnie jako lek przeciwpadaczkowy oraz w leczeniu bólu neuropatycznego. Potencjalna aktywność i możliwości wykorzystania innych inhibitorów GAT-1- GAT-4 nie są do końca jasne. Ostatnio potwierdzono przeciwdrgawkową aktywność wysoce selektywnego związku w stosunku do mGAT4 – (S)-SNAP-5114²³.

W oparciu o dotychczasową wiedzę bardzo wiele różnego typu inhibitorów GAT-1, włączając w to tiagabinę, zostało przetestowanych pod kątem ich wpływu na proces odczuwania bólu i aktywności przeciwbólowej u myszy. Wykorzystywano do tego takie testy, jak: test formalinowy, test gorącej płytki, test usuwania ogona oraz test wicia. Selektywne inhibitory GAT-1, jak nipekotat etylu i związek NO-711, wykazywały znaczące działanie przeciwbólowe zarówno u zwierząt z wyłączonym genem dla GAT-1, jak i z nadekspresją GAT-1 u myszy transgenicznych. Wszystkie badania potwierdzały udział GAT-1 w regulacji procesów bólowych, co można przełożyć na możliwość poszukiwania i odkrywania nowych leków przeciwbólowych działających poprzez hamowanie GAT-1²⁴.

Odpowiedź analgetyczną w przypadku myszy z wyłączonym genem dla GAT-1 (GAT(-/-)) w porównaniu do heterozygot (GAT(+/-)) i dzikiego typu (GAT(+/+)) myszy wykorzystano w badaniach przesiewowych bólu. Te dane pokazują, że w przypadku zahamowania GAT-1 (na przykład poprzez genetyczny niedobór lub ostrą blokadę selektywnych inhibitorów) prowadzi to do hipoalgezji u myszy. Badania te potwierdzają kluczową rolę GAT-1 w regulacji progu bólowego i wskazują, że dwa selektywne inhibitory GAT-1, czyli tiagabina i NO-711, wykazują bardzo obiecujący potencjał wykorzystania w klinicznych przypadkach leczenia bólu. Ponadto, wykazano również, że obwodowo usytuowany transporter GAT-3 może odgrywać rolę regulacyjną w przypadku obwodowych mechanizmów GABA-ergicznyc, kontrolujących liczne patologiczne procesy, włączając w to również ból²⁵.

²³ P. Kowalczyk et al., *Synthesis, Biological Evaluation and Structure-activity Relationship of new GABA Uptake Inhibitors, Derivatives of 4-aminobutanamides*, "Eur. J. Med. Chem." 2014, No. 83, s. 256–273.

²⁴ C. H. Ng et al., *Increased Expression of γ -aminobutyric Acid Transporters GAT-1 and GAT-3 in the Spinal Trigeminal Nucleus after Facial Carrageenan Injection*, "Pain" 2001, No. 92 (1–2), s. 29–40; J. H. Hu et al., *Hyperalgesic Effects of γ -aminobutyric Acid Transporter 1 in Mice*, "J. Neurosci. Res." 2003, No. 73 (4), s. 565–572.

²⁵ A. Ipponi et al., op. cit.; Y. Xu et al., op. cit.

UKŁAD GABA-ERGICZNY A BÓL PRZEWLEKŁY

Bardzo ważny z punktu widzenia medycyny jest udział układu GABA-ergicznego w powstawaniu i leczeniu bólu przewlekłego. Liczne badania sugerują istotną rolę obniżonego przekazywania GABA-ergicznego w rozwoju bólu neuropatycznego. W wyniku przewlekłych urazów dochodzi do znacznej redukcji aktywności układu GABA-ergicznego w obrębie powierzchniowych rogów grzbietowych rdzenia, podczas gdy u zdrowych osób układ ten wykazuje znaczną aktywność. Ponadto, na podstawie innych badań wykazano utratę znacznej ilości receptorów GABA pośredniczących w hamowaniu rdzeniowym w wyniku przewlekłych urazów. Ubytek GABA w zakończeniach nerwowych rogów grzbietowych rdzenia i w związku z tym ograniczenie aktywności hamującej tego neuroprzekaznika sugeruje rolę deficytu GABA w rozwoju bólu neuropatycznego w przebiegu długotrwałych uszkodzeń ciała poprzez redukcję ilości białek GAT-1 w rdzeniu. W przypadku innych badań wykazano nadekspresję GAT-1 w rdzeniu²⁶.

Podanie miejscowe NO-711 do rogu tylnego rdzenia u szczurów powodowało zależne od stężenia zwiększenie zewnątrzkomórkowej ilości GABA. Narastający poziom GABA selektywnie hamował depolaryzację wywołaną uwalnianiem EAA, co pośrednio odpowiadało za aktywację receptorów GABA. Sugeruje się, że inhibitory wychwytu zwrotnego GABA poprzez hamowanie GAT-1 pośrednio hamują uwalnianie EAA w obrębie rdzenia kręgowego, co może odpowiadać za działanie przeciwbólowe tej grupy leków²⁷.

TIAGABINA – JEDEN Z PIERWSZYCH SELEKTYWNYCH INHIBITORÓW GAT-1

Najbardziej znanym inhibitorem GAT-1 jest tiagabina. Wynika to z faktu, że jest to jedyny związek o takim profilu działania dopuszczony do stosowania jako lek przeciwpadaczkowy. Tiagabina jest pochodną kwasu nipekotynowego, wykorzystywaną jako lek wspomagający w terapii padaczki, w napadach czę-

²⁶ D. R. Gosselin et al., *Upregulation of the GABA Transporter GAT-1 in the Gracile Nucleus in the Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain*, "Neurosci. Lett." 2010, No. 480 (2), s. 132–137.

²⁷ G. Miletic et al., *Muscimol Prevents Long-lasting Potentiation of Dorsal Horn Field potentials in rats with chronic constriction injury exhibiting decreased levels of the GABA Transporter GAT-1*, "Pain" 2003, No. 105 (1–2), s. 347–353; M. A. R. C. Daemen et al., *Upregulation of the GABA-transporter GAT-1 in the Spinal Cord Contributes to Pain Behaviour in Experimental Neuropathy*, "Neurosci. Lett." 2008, No. 444 (1), s. 112–115.

ściowych i padaczce lekoopornej. Jest ona również obecnie wykorzystywana w badaniach klinicznych nowych wskazań, włączając w to leczenie neuropatii cukrzycowej, nerwobóli, migreny, terapii bólu przewlekłego pourazowego, jak również jako jeden z leków mogących przerywać bardzo niebezpieczny stan padaczkowy (*status epilepticus*).

Tiagabina jest wysoce selektywnym inhibitorem transportera GAT-1. Może to ograniczyć jej aktywność do rejonów OUN, w których GAT-1 odgrywa szczególną rolę (hipokamp, mózdzek i kora). Lek ten generuje zależny od dawki wzrost zewnątrzkomórkowego poziomu GABA w mózgu szczurów. Wykazuje bardzo szeroką i silną aktywność hamującą w stosunku do drgawek wywołanych podskórnym podaniem pentetrazolu, jak również w przypadku napadów ogniskowych, natomiast jest praktycznie nieaktywna w przypadku napadów generowanych w teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES). Została ona również szeroko przebadana na zwierzętach pod kątem innych możliwych właściwości. Tiagabina w testach na zwierzętach przejawiała potencjalną aktywność przeciwlękową. W testach bólu na gryzoniach wykazuje ona właściwości antynocyceptywne w teście gorącej płytki oraz przeciwdziała powstawaniu allodynii (czyli przeculicy). Potwierdzają to badania, w których lek ten w umiarkowanych dawkach (7,2 i 24,3 $\mu\text{mol/kg}$) znacząco redukuje odczuwanie bólu przez myszy. Należy jednak podkreślić, iż na chwilę obecną wykorzystanie tiagabiny na szeroką skalę jako leku przeciwbólowego jest ograniczone ze względu na liczne działania niepożądane²⁸.

Wykazano również, że jednoczesne podawanie tiagabiny i gabapentyny w teście gorącej płytki, który jest modelem bólu ostrego, generuje znacznie większą aktywność przeciwbólową niż zastosowanie samej tiagabiny. Jednak w przypadku tiagabiny należy również wziąć pod uwagę fakt, że dawka wykazująca działanie analgetyczne wywołuje jednocześnie silną sedację u myszy. Związek ten osłabia aktywność lokomotoryczną zwierząt eksperymentalnych, co można przypisać mechanizmowi działania tego leku. Z tego względu należy być ostrożnym w kwestii interpretacji wyników dotyczących działania analgetycznego²⁹.

²⁸ W. J. Gardina et al., *An Evaluation of the GABA Uptake Blocker Tiagabine in Animal Models of Neuropathic and Nociceptive Pain*, "Drug Dev. Res." 1998, No. 44 (2–3), s. 106–113; U. Schmitt et al., *Effects of GABA-transporter (GAT) Inhibitors on Rat Behavior in Open-field and Elevated Plus-maze*, "Behav. Pharmacol." 1999, No. 10 (2).

²⁹ N. O. Dalby, op. cit.; K. Sałat et al., *Anticonvulsant Active Inhibitor of GABA Transporter Subtype 1, Tiagabine, with Activity in Mouse Models of Anxiety, Pain and Depression*, "Pharmacol. Rep." 2015, No. 67 (3), s. 465–472.

POSZUKIWANIE NOWYCH STRUKTUR WPLYWAJĄCYCH NA AKTYWNOŚĆ GAT

Nowe związki zsyntetyzowane i badane pod kątem aktywności hamującej względem białek GAT dostarczają zachęcających wyników i mogą stanowić punkt wyjścia w poszukiwaniu coraz bardziej selektywnych struktur. Związek oznaczony symbolem 15c, wykazujący bardzo silne powinowactwo i zdolność hamowania transportera GAT-4, wykazał znaczące statystycznie działanie przeciwdrgawkowe i jednocześnie bardzo silne działanie przeciwbólowe przy jednoczesnej silnej redukcji aktywności lokomotorycznej³⁰.

Poszukiwanie coraz nowszych i aktywniejszych związków wykazujących działanie hamujące na wychwyt zwrotny GABA ze szczeliny synaptycznej poprzez inhibicję białek transportujących ten neuroprzekaźnik jest prowadzone na szeroka skalę. Próby modyfikacji chemicznej w obrębie struktur już dobrze znanych i przebadanych pod kątem ich aktywności hamującej względem GAT prowadzą do powstawania licznych nowych pochodnych, które następnie bada się pod kątem aktywności biologicznej i możliwości wykorzystania w medycynie. Modyfikacji strukturalnej poddaje się między innymi kwas nipekotynowy, którego pochodną jest tiagabina, a w jego obrębie próbuje się modyfikować grupę aminową poprzez wprowadzanie dużych i lipofilnych grup. Opierając się na badaniach zależności struktury związku od jego aktywności (SAR), bada się również nowe pochodne trójcykliczne kwasu nipekotynowego zawierające lipofilowe ugrupowania. Wśród nich najbardziej obiecującą strukturą okazał się związek oznaczony symbolem 6, który pomimo słabszego potencjału przyłączania się do białek transportujących GABA w stosunku do tiagabiny wykazywał porównywalną wartość indeksu terapeutycznego. Dlatego też uważa się, że związek 6 może posłużyć jako struktura wiodąca w badaniach mających na celu poszukiwanie nowych leków przeciwpadaczkowych i przeciwbólowych³¹.

Jest to szczególnie ważne z punktu widzenia zakresu aktywności potencjalnych związków o takim mechanizmie działania. Już w przypadku tiagabiny wykorzystywanej w terapii padaczki wykazano również jej aktywność przeciwbólową, przeciwłękową, przeciwdepresyjną i potencjalne możliwości jej stosowania w leczeniu różnych zaburzeń psychicznych. Powstające nowe związki mogą okazać się bardziej selektywnymi i silniejszymi inhibitorami względem innej grupy białek transportujących GABA albo wykazywać taki potencjał bez wpły-

³⁰ P. Kowalczyk et al., *Synthesis, Biological Evaluation and Structure-activity Relationship of new GABA Uptake Inhibitors, Derivatives of 4-aminobutanamides*, op. cit.

³¹ K. Sałat et al., *Synthesis and Pharmacological Properties of New GABA Uptake Inhibitors*, "Pharmacol. Rep." 2012, No. 64 (4), s. 817–833; K. Sałat, K. Kulig, *GABA Transporters as Targets for New Drugs*, op. cit.

wu hamującego na aktywność lokomotoryczną. Poszukiwanie takich struktur jest bardzo potrzebne, ponieważ istnieje duże prawdopodobieństwo odkrycia w ten sposób nowych leków wykazujących szeroki zakres działań, a jednocześnie charakteryzujących się zmniejszonym potencjałem generowania działań niepożądanych.

PODSUMOWANIE

Podsumowując, należy podkreślić rolę układu GABA-ergicznego w modulacji i wpływie na wiele różnych procesów toczących się w organizmie ssaków. Poszukiwanie i badanie nowych struktur oddziałujących na układ GABA-ergiczny jest szczególnie ważne, ponieważ może umożliwić udoskonalenie leczenia bólu i umożliwić lekarzom dobór farmakoterapii w sposób bardziej indywidualny i holistyczny. Co więcej, w indywidualnych przypadkach wybór odpowiedniego leku (lub leków) będzie mógł odbywać się w sposób oparty na takiej ordynacji substancji leczniczych, aby stosując pojedyncze substancje, leczyć jednocześnie kilka schorzeń, na które cierpi pacjent. Również ze względu na ciągle aktualny problem mało efektywnego leczenia bólu nowe związki umożliwią łagodzenie jego odczuwania w trudnych klinicznie przypadkach. W tym względzie dotychczasowe badania są bardzo obiecujące i najprawdopodobniej w najbliższych latach można się spodziewać doniesień o coraz nowszych strukturach chemicznych działających poprzez wpływ na GAT i ich szerszym zastosowaniu nie tylko w terapii bólu, ale jednocześnie w innych wskazaniach terapeutycznych.

GABA TRANSPORTERS AS A THERAPEUTIC TARGET FOR NEW ANALGESIC DRUGS

ABSTRACT

γ -aminobutyric acid (GABA) is a widely distributed neurotransmitter in the mammalian central nervous system. Cortical GABA regulates a number of cognitive functions including attention, and working memory and is dysregulated in a number of psychiatric conditions like schizophrenia, insomnia, epilepsy and anxiety disorders. GABA-ergic neurotransmission disorders can exacerbate pain sensations. GABA is removed from the synaptic cleft by specific proteins called plasma membrane GABA transporters (GAT). Mechanisms through which the reported antinociceptive activity of GABA re-uptake inhibitors is mediated have not been defined. In the present work we focus on antinociceptive properties of new compounds which have the ability to inhibit the uptake of GABA and their use as potential drugs for the treatment of pain.

KEYWORDS

γ -aminobutyric acid, GABA transporters, GAT, tiagabine, pain, GABA re-uptake

BIBLIOGRAFIA

1. Borden L. A., *GABA Transporter Heterogeneity: Pharmacology and Cellular Localization*, "Neurochem. Int." 1996, No. 29 (4), s. 335–356.
2. Calignano A., La Rana G., Giuffrida A., Piomelli D., *Control of Pain Initiation by Endogenous Cannabinoids*, "Nature" 1998, No. 394, s. 277–281.
3. Daemen M. A. R. C. et al., *Upregulation of the GABA-transporter GAT-1 in the Spinal Cord Contributes to Pain Behaviour in Experimental Neuropathy*, "Neurosci. Lett." 2008, No. 444 (1), s. 112–115.
4. Dalby N. O., *Inhibition of γ -aminobutyric Acid Uptake: Anatomy, Physiology and Effects Against Epileptic Seizures*, "Eur. J. Pharmacol." 2003, No. 479 (1–3), s. 127–137.
5. Enna S. J., *The GABA Receptors*, "Adv. Pharmacol." 2006, Vol. 54.
6. Fundytus M. E., *Glutamate Receptors and Nociception: Implications for the Drug Treatment of Pain*, "CNS Drugs." 2001, No. 15, s. 29–58.
7. Gardina W. J. et al., *An Evaluation of the GABA Uptake Blocker Tiagabine in Animal Models of Neuropathic and Nociceptive Pain*, "Drug Dev. Res." 1998, No. 44 (2–3), s. 106–113.
8. Gosselin D. R. et al., *Upregulation of the GABA Transporter GAT-1 in the Gracile Nucleus in the Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain*, "Neurosci. Lett." 2010, No. 480 (2), s. 132–137.
9. Hu J. H. et al., *Hyperalgesic Effects of γ -aminobutyric Acid Transporter I in Mice*, "J. Neurosci. Res." 2003, No. 73 (4), s. 565–572.
10. Ipponi A. et al., *Tiagabine Antinociception in Rodents Depends on GABA(B) Receptor Activation: Parallel Antinociception Testing and Medial Thalamus GABA Microdialysis*, "Eur. J. Pharmacol." 1999, No. 368 (2–3), s. 205–211.
11. Iversen L., *Neurotransmitter Transporters and their Impact on the Development of Psychopharmacology*, "Br. J. Pharmacol." 2006, No. 147 (1), s. 82–88.
12. Kania B. F., Juniak M., *Endogenne peptydy opioidowe a ból trzewny*, „Życie Wet.” 2010, nr 85 (3), s. 223–226.
13. Karpowicz-Kulesza D., *Ból neuropatyczny i korzeniowy – czyli zespoły bólowe neurogenne*, "Post. Psychiatr. Neurol." 1998, No. 7, s. 61–67.
14. Kowalczyk P. et al., *2-Substituted 4-hydroxybutanamides as Potential Inhibitors of γ -Aminobutyric Acid Transporters mGAT1–mGAT4: Synthesis and Biological Evaluation*, "Bioorg. Med. Chem." 2013, No. 21 (17), s. 5145–5167.
15. Kowalczyk P. et al., *Synthesis, Biological Evaluation and Structure-activity Relationship of new GABA Uptake Inhibitors, Derivatives of 4-aminobutanamides*, "Eur. J. Med. Chem." 2014, No. 83, s. 256–273.
16. Kwiatkowski K., Mika J., *Rola chemokin w bólu neuropatycznym*, „Ból” 2014, nr 15 (1), s. 19–35.
17. Lajtha A., *Handbook of Neurochemistry and Molecular Biology*, "Neural Membranes and Transport" 2007.
18. Meller S. T., Dykstra C., Gebhart G. F., *Acute Mechanical Hyperalgesia in the Rat Can Be Produced by Coactivation of Spinal Ionotropic AMPA and metabotropic glutamate receptors, activation of phospholipase A2 and generation of Cyclooxygenase Products*, "Prog. Brain Res." 1995, No. 110, s. 177–192.

19. Miletic G. et al., *Muscimol Prevents Long-lasting Potentiation of Dorsal Horn Field potentials in rats with chronic constriction injury exhibiting decreased levels of the GABA Transporter GAT-1*, "Pain" 2003, No. 105 (1–2), s. 347–353.
20. Ng C. H. et al., *Increased Expression of γ -aminobutyric Acid Transporters GAT-1 and GAT-3 in the Spinal Trigeminal Nucleus after Facial Carrageenan Injection*, "Pain" 2001, No. 92 (1–2), s. 29–40.
21. Olszanecki R., Wołkow P., Jawień J., *Farmakologia*, red. R. Korbut, Warszawa 2012.
22. Podkowa A. et al., *Pharmacological Activity of Novel GABA Re-uptake Inhibitors in Mice*, "Junio" 2014, No. 26 (1), s. 32–40.
23. Sadock B. J., Sadock V. A., *Kaplan and Sadock's Consise Textbook of Clinical Psychiatry*, 3rd Edition, Philadelphia 2008.
24. Sałat K. et al., *Anticonvulsant Active Inhibitor of GABA Transporter Subtype 1, Tiagabine, with Activity in Mouse Models of Anxiety, Pain and Depression*, "Pharmacol. Rep." 2015, No. 67 (3), s. 465–472.
25. Sałat K. et al., *Synthesis and Pharmacological Properties of New GABA Uptake Inhibitors*, "Pharmacol. Rep." 2012, No. 64 (4), s. 817–833.
26. Sałat K., Kulig K., *GABA Transporters as Targets for New Drugs*, "Future Med. Chem." 2011, No. 3 (2), s. 211–222.
27. Schmitt U. et al., *Effects of GABA-transporter (GAT) Inhibitors on Rat Behavior in Open-field and Elevated Plus-maze*, "Behav. Pharmacol." 1999, No. 10 (2).
28. Smith C. G. S. et al., *GABA Transporter Type 1 (GAT-1) Uptake Inhibition Reduces Stimulated Aspartate and Glutamate Release in the Dorsal Spinal Cord In Vivo Via Different GABAergic Mechanisms*, "Neuropharmacol." 2007, No. 53 (8), s. 975–981.
29. Soudijn W., van Wijngaarden I., *The GABA Transporter and Its Inhibitors*, "Curr. Med. Chem." 2000, No. 7 (10), s. 1063–1079.
30. Suchorzewski M., Wujtewicz M., *Opioidy w leczeniu bólu neuropatycznego*, „Pol. Med. Paliatywna” 2007, nr 1 (2), s. 49–53.
31. Szczudlik A. et al., *Rozpoznanie i leczenie bólu neuropatycznego: przegląd piśmiennictwa i zalecenia Polskiego Towarzystwa Badania Bólu i Towarzystwa Neurologicznego – część druga*, „Ból” 2014, nr 15 (3), s. 8–21.
32. Wróbel K., Wróbel A., *Ból – analiza zagadnienia, przegląd piśmiennictwa*, „Eduk. Biol. Śr.” 2015, nr 2, s. 20–26.
33. Xu Y. et al., *Hypoalgesia in Mice Lacking GABA Transporter Subtype 1*, "Neurosci. Res." 2008, No. 86 (2), s. 465–470.
34. Żylicz Z., Krajnik M., *Jak powstaje ból? Neurofizjologia bólu dla początkujących*, „Pol. Med. Paliatywna” 2003, nr 2 (1), s. 49–56.