

Received: 2004.02.09

Accepted: 2003.03.20

Published: 2004.04.15

## Nocyceptyna/orfanina FQ (N/OFQ) – opioid, antyopiod czy neuromodulator?

### Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) – the opioid, antiopiod or neuromodulator?

**Jolanta Kotlińska, Piotr Rafalski**

Katedra i Zakład Farmakodynamiki Akademii Medycznej im. prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie

#### Streszczenie

Nocyceptyna/orfanina FQ (N/OFQ) jest peptydem odkrytym w połowie lat 90. XX w., którego sekwencja aminokwasów wykazuje duże podobieństwo do sekwencji endogennych peptydów opioidowych, szczególnie do dynorfiny A. Jednakże ze względu na brak N-końcowej tyrozyny w pierwszej pozycji, N/OFQ nie wiąże się z opioidowymi receptorami  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$ , natomiast jest ligandem receptora nocyceptynowego (NOP). Z kolei endogenne peptydy opioidowe nie wiążą się z receptorem NOP. Pomimo strukturalnego podobieństwa działanie farmakologiczne N/OFQ różni się od działania opioidów i w wielu przypadkach jest przeciwne. N/OFQ podana do komory bocznej mózgu zwierząt wywołuje nadwrażliwość na ból i znosi analgezję wywołaną opioidami, natomiast podana do rdzenia kręgowego wykazuje działanie analgetyczne. Sama nie wykazuje właściwości nagradzających, ale blokuje działanie nagradzające morfiny, etanolu oraz psychostymulantów, takich jak kokaina czy amfetamina. Jak wszystkie peptydy, N/OFQ podlega metabolizmowi enzymatycznemu do krótszych fragmentów, takich jak N/OFQ(1-13), N/OFQ(1-11), N/OFQ(1-7) czy N/OFQ(1-6). Fragmenty te wykazują aktywność biologiczną. Działanie N/OFQ prawdopodobnie jest związane z regulacją uwalniania neuroprzekazników i hormonów, gdyż receptory NOP są głównie umiejscowione na zakończeniach presynaptycznych neuronów w wielu strukturach układu nerwowego. Celem pracy było przedstawienie roli N/OFQ w fizjologii odczuwania bólu oraz wpływie tego peptydu na nagradzające i uzależniające działanie niektórych leków.

**Słowa kluczowe:** nocyceptyna • orfanina FQ • nocycepcja • działanie nagradzające leków • uzależnienia lekowe

#### Summary

Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) is a neuropeptide discovered in the middle of the 1990. It possesses an amino acid sequence very similar to those of endogenous opioid peptides (particularly dynorphin A). However, N/OFQ lacks the N-terminal tyrosine necessary for activation of  $\mu$ -,  $\kappa$ - and  $\delta$ - opioid receptors and therefore does not bind to opioid receptors but to its own nociceptin receptor (NOP). Opioid peptides also do not bind to the NOP receptor. In spite of structural similarities, the pharmacological profile of N/OFQ is different from and, in many cases, opposite to that of the opioids. Intracerebroventricular injection of N/OFQ induces hyperalgesia and decreases the analgesic actions of opioids, but induces analgesia when given intrathecally. N/OFQ blocks the rewarding effects of morphine, ethanol, and psychostimulants such as cocaine and amphetamine, but given alone it does not have rewarding effect. N/OFQ is metabolized to shorter fragments, such as N/OFQ(1-13), N/OFQ(1-11), N/OFQ(1-7) and N/OFQ(1-6). These fragments show biological activity. The effects of N/OFQ include regulation of the release of numerous neurotransmitters and hormones, as NOP receptors are located presynaptically in different brain structures. The aim of this review was to present current opinion on the role of N/OFQ in nociception, reward and drug dependence.

**Key words:** nociceptin • orphanin FQ • nociception • drug reward • drug dependence

<b>Full-text PDF:</b>	<a href="http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/5415.pdf">http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/5415.pdf</a>
<b>Word count:</b>	3098
<b>Tables:</b>	–
<b>Figures:</b>	–
<b>References:</b>	81

**Adres autora:** Dr hab. Jolanta Kotlińska, Katedra i Zakład Farmakodynamiki AM im. prof. F. Skubiszewskiego, ul. Staszica 4, 20-081 Lublin, e-mail: jolka@panaceum.am.lublin.pl

Preparaty opium były używane przez setki lat jako środki przeciwbólowe czy zapięrające, ale dopiero na początku XIX wieku wyizolowano z soku niedojrzałych makówek maku lekarskiego alkaloid, który później nazwano morfiną. Już wtedy przypuszczano, że sztywna struktura stereochemiczna tego związku wiąże się w ustroju ze specyficznymi strukturami białkowymi, które później odkryto i nazwano receptorami opioidowymi. Obecnie wiadomo, że istnieją trzy główne typy receptorów opioidowych, są to receptory  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$  oraz cztery grupy endogennych ligandów tych receptorów o budowie peptydowej, tj. enkefalin, endorfiny, dynorfiny oraz odkryte w 1997 roku – endomorfiny [79].

Badania ostatnich dziesięciu lat przyniosły znaczny postęp w identyfikacji genów odpowiedzialnych za powstawanie receptorów opioidowych i przyczyniły się do odkrycia nowego receptora, który swoją budową przypomina receptory opioidowe [47]. Receptor ten zbudowany jest, podobnie jak receptory opioidowe, z 7 transbłonowych domen i podobnie jak receptory opioidowe związany z białkiem G jako wtórnym neuroprzekaznikiem. Jednakże peptydy opioidowe nie wiążą się z tym receptorem ani nie znaleziono endogennego ligandu tego receptora, dlatego nazwano go receptorem orfaninowym (orphan znaczy sierocy) lub receptorem opioidopodobnym (opioid receptor-like 1 – ORL1) [47]. Receptor orfaninowy nie był jednak długo receptorem sierocym, gdyż już wkrótce, w 1995 roku, dwa niezależne ośrodki naukowe prowadzone przez Meuniera i wsp. [42] oraz Reinscheida i wsp. [62] wyizolowały z mózgu szczura i świnki morskiej peptyd, który swoją budową przypominał peptyd opioidowy – dynorfinę A. Zbudowany podobnie jak dynorfina A, z 17 reszt aminokwasowych, w sekwencji aminokwasów był bardzo podobny do dynorfiny. Meunier i wsp. [42] nazwali ten peptyd nocycetyną, gdyż podany do komory bocznej mózgu myszy wywoływał u tych zwierząt zwiększoną wrażliwość na ból. Z powodu wykazywanego powinowactwa do receptora orfaninowego, drugi z ośrodków nazwał go orfaniną FQ (FQ – ze względu na pierwszy aminokwas w sekwencji F - fenyloalaninę i ostatni aminokwas Q - glutaminę) [62]. W piśmiennictwie przyjęto podwójną nomenklaturę dla tego peptydu – nocycetyna/orfanina FQ, w skrócie N/OFQ i skrót ten będzie używany w dalszej części pracy.

Komórkowy mechanizm działania N/OFQ jest podobny do działania peptydów opioidowych [43]. Podobnie jak peptydy opioidowe, N/OFQ hamuje za pośrednictwem białek G aktywność cykazy adenylanowej, nasila aktywność kanałów potasowych oraz hamuje aktywność kanałów wapniowych napięciowależnych. Te efekty nie są ha-

mowane przez antagonistę receptorów opioidowych – nalokson [49]. Oznacza to, że mechanizm działania N/OFQ nie jest związany z wpływem na receptory opioidowe. W przeważającej mierze działanie N/OFQ prowadzi do hiperpolaryzacji błony komórkowej neuronów i hamowania uwalniania neuroprzekazników [2].

Co więcej, podobnie jak endogenne peptydy opioidowe, które powstają z prekursorowych peptydów np.:  $\beta$ -endorfina z preproopiomelanokortyny, enkefalin z preproenkefalin, dynorfiny z preprodynorfiny czy endomorfiny prawdopodobnie z proendomorfiny (choć ta cząsteczka jeszcze nie została zidentyfikowana), N/OFQ powstaje z białka prekursorowego, prepronocyceptyny [48].

Ze względu na te podobieństwa Kongres Farmakologiczny w Monachium w 1998 roku zakwalifikował receptor N/OFQ do grupy receptorów opioidowych i nazwał go receptorem OP4 [18]. Receptory opioidowe  $\mu$  nazwano OP3, dla których endogennym agonistą są endomorfiny, receptory enkefalin, dawniej zwane  $\delta$ , nazwano OP1, a dla dynorfin, dawniej zwane  $\kappa$  – OP2. Ostatnio, kongres IUPHAR zasugerował nową nomenklaturę i receptory opioidowe  $\delta$  nazwano DOP, receptory  $\kappa$  – KOP, receptory  $\mu$  – MOP, a receptory orfaninowe nazwano NOP (nociceptin peptide) [8]. To nowe nazewnictwo – NOP dla receptorów orfaninowych, obecnie zwanych częściej nocycetynowymi, będzie używana w dalszej części pracy.

Jak już wcześniej wspomniano, struktura N/OFQ bardzo przypomina strukturę dynorfiny A. Jednakże, w przeciwieństwie do peptydów opioidowych, w sekwencji czterech pierwszych aminokwasów na N-końcu peptydu określonej jako „address“, N/OFQ zawiera fenyloalaninę, a nie tyrozynę, co decyduje, że N/OFQ nie wiąże się z klasycznymi receptorami opioidowymi. Analogicznie, endogenne peptydy opioidowe nie wiążą się z receptorem NOP [65].

N/OFQ jest metabolizowana przez enzymy proteolityczne do krótszych fragmentów, które wykazują aktywność biologiczną. Produktami rozkładu N/OFQ na poziomie ponadrdzeniowym (np. w hipokampie) są N/OFQ(1-13), N/OFQ(1-11) i N/OFQ(1-7) [69]. Z kolei na poziomie rdzenia kręgowego produktami metabolizmu są fragmenty N/OFQ(1-11), a następnie N/OFQ(1-6) [68]. Fragmenty metabolizmu N/OFQ wykazują działanie biologiczne, głównie przebadane w testach bólowych [65, 68]. Ich działanie będzie omówione w dalszej części pracy.

Dostępne są syntetyczne związki będące ligandami receptora NOP. Ze względu na zdolność przenikania bariery

kręgowo-mózg mogą być podawane obwodowo. Związki te są zarówno agonistami receptora NOP np. Ro 65-6570, tj. (8-acenaften-1-yl-1-fenyl-1, 3, 8-triaza-spiro [4, 5]dekan-4-on), Ro 64-6198 ((1S, 3aS)-8-(2, 3, 3a, 4, 5, 6-heksahydro-1H-fenalen-1-yl)-1-fenyl-1, 3, 8-triaza-spiro [4, 5] dekan-4-on) czy antagonistami, takimi jak: JTC-801 (N - (4 - amino -2 -metylocholinolono-yl) - 2 - (4 - etylofenoksymetylo) benzamidu chlorowodorek i J - 113398 (1 - [(3R, 4R) - 1 - cyklooctylometylo - 3 - hydroksymetylo - 4 - piperidylo] -3 - etylo - 1, 3 - dihydro - 2H - benzimidazol - 2 - on) [80].

Rozmieszczenie receptorów NOP i receptorów opioidowych oraz odpowiednich dla nich peptydowych ligandów w ośrodkowym układzie nerwowym wykazuje zróżnicowanie, chociaż istnieją punkty spójne [21, 67]. Wykazano współistnienie N/OFQ i jej receptorów oraz peptydów pochodzących z proopiomelanokortyny np. w jądrze łukowatym czy podwzgórz, występowanie receptorów NOP na neuronach enkefalinergicznym w jądrze łukowatym przegrody, hipokampie, jądrze migdałowatym oraz współistnienie dynorfiny i N/OFQ np. w substancji czarnej i jądrze łukowatym [46]. W rdzeniu kręgowym stwierdzono umiejscowienie włókien nerwowych zawierających peptydy opioidowe i N/OFQ [63].

Biologiczne działanie N/OFQ różni się od działania peptydów opioidowych. W zależności od sposobu podania, N/OFQ wywołuje u zwierząt zwiększoną wrażliwość na ból (hiperalgezę) albo działanie przeciwbólowe (antynocycję) [46]. N/OFQ oraz agonista receptorów NOP, syntetyczny związek Ro 64-6198, wykazują działanie przeciwlękowe (anksjolityczne) zbliżone do działania benzodiazepin [16, 22]. Jednak w przeciwieństwie do benzodiazepin, substancje te nie działają przeciwdrgawkowo [22]. Działanie anksjolityczne tych substancji prawdopodobnie jest związane z wpływem na uwalnianie serotoniny [46]. N/OFQ, podobnie jak morfina, zwiększa spożywanie pokarmów. Efekt ten jest hamowany przez antagonistę receptorów opioidowych – nalokson [60]. Mogłoby to sugerować, że układ opioidowy jest zaangażowany w działanie nocyceptyny. Ponadto N/OFQ podana do komory bocznej mózgu wpływa na aktywność lokomotoryczną zwierząt, w zależności od dawki: małe dawki (pmol) pobudzają, a większe (nmol) hamują aktywność motoryczną [10]. Dane z piśmiennictwa sugerują, że to działanie N/OFQ jest związane z jej modulującym wpływem na neuroprzekaznictwo dopaminergiczne i glutaminianergiczne w prążkowie [15, 27]. N/OFQ oraz Ro 64-6198 wpływają na nagradzające właściwości różnych substancji o potencjale uzależniającym, chociaż same takich właściwości nie mają. Potwierdzono to w teście warunkowej preferencji miejsca [9]. N/OFQ hamuje nagradzające właściwości morfiny [5], etanolu [34], kokainy [31] oraz zmniejsza spożywanie etanolu u zwierząt [4]. To działanie N/OFQ jest prawdopodobnie związane z hamowaniem mezolimbicznej transmisji dopaminowej [53]. N/OFQ hamuje również procesy plastyczności synaptycznej związane z długotrwałym wzmocnieniem synaptycznym (przez hamowanie syntezy cAMP) [76] oraz pamięć przestrzenną [66]. Jest to podobne do działania opioidów i zależy od wpływu N/OFQ na uwalnianie kwasu glutaminowego [77]. N/OFQ hamuje także uwalnianie acetylocholin [59], kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) [72]

oraz  $\beta$ -endorfin w jądrze łukowatym przez co może ograniczać uwalnianie endogennych opioidów w strukturach limbicznych, takich jak brzuszne pole nakrywki mostu (ventral tegmental area – VTA) i jądro półleżące przegrody (nucleus accumbens – NAcc) [73]. Wpływa również na uwalnianie hormonów związanych ze stresem, takich jak ACTH i kortykosteron [11] oraz reguluje czynność osi przysadka-podwzgórze [73].

Ze względu na podobieństwo w budowie N/OFQ do peptydów opioidowych omówiony będzie szerzej udział N/OFQ w najbardziej charakterystycznych dla opioidów efektach, a więc w testach bólowych, w uzależnieniu i objawach abstynencji morfinowej oraz w nagradzającym działaniu substancji wywołujących uzależnienie.

## N/OFQ A BÓL

Najbardziej charakterystycznym działaniem opioidów jest działanie przeciwbólowe. Ze względu na podobieństwo N/OFQ do peptydów opioidowych, większość badań doświadczalnych dotyczy jej wpływu na odczuwanie bólu. Jak już wcześniej wspomniano, wpływ N/OFQ na odczuwanie bólu zależy od drogi podania [46]. N/OFQ podana do rdzenia kręgowego wywołuje u zwierząt działanie antynocyceptywne (przeciwbólowe) [17, 75]. Jednakże brak tolerancji krzyżowej z morfiną [19] sugeruje, że układ opioidowy nie bierze bezpośrednio udziału w analgezji wywołanej podaniem N/OFQ. Istnieją również dane z piśmiennictwa, mówiące o powstaniu hiperalgezji (zwiększonej wrażliwości na ból) i/lub allodynii (odczucia bólu po zadziaaniu bodźca niebólowego np. dmuchnięcia) po podaniu N/OFQ do rdzenia kręgowego [57].

Zupełnie inne reakcje zwierząt obserwowano po podaniu N/OFQ do komory bocznej mózgu. Występuje wówczas hiperalgeza [42, 62], która przez Mogiła i wsp. [45] została uznana za działanie antyopioioidowe tego peptydu. Mogil i wsp. [45] sugerowali, że N/OFQ hamuje działanie endogennych peptydów opioidowych uwalnianych w reakcji stresowej związanej z iniekcją. To działanie N/OFQ sugerowało jej antyopioioidowy charakter [62]. N/OFQ podana do komory bocznej mózgu zapobiega analgezji wywoływanej agonistami receptorów opioidowych nie tylko  $\mu$ , ale również  $\delta$  i  $\kappa$  [7, 44]. N/OFQ znosi działanie analgetyczne morfiny podanej miejscowo do struktur zaangażowanych w przekazywanie bólowe, takich jak istota szara okołowodociągowa (periaqueductal gray matter – PAG) [50] oraz do korzeni brzusznych rdzenia kręgowego (rostral ventromedial medulla – RVM) [20, 58]. Można więc przypuszczać, że N/OFQ działa jako „funkcjonalny antagonist” opioidów bez bezpośredniego wpływu na receptory opioidowe. Antagonistyczne działanie N/OFQ względem analgezji morfinowej trwa 4–6 godzin [3], chociaż już po następnym podaniu N/OFQ występuje zjawisko tolerancji [37]. Co więcej, przewlekłe podawanie morfiny powoduje zwiększoną biosyntezę oraz uwalnianie N/OFQ w różnych strukturach mózgu szczurów [78]. Przewlekłe podawanie N/OFQ jednakże w istotny sposób hamuje powstawanie tolerancji na działanie analgetyczne morfiny [39].

Za pronocyceptywne działanie N/OFQ są odpowiedzialne receptory NOP, gdyż myszy genetycznie pozbawione

tych receptorów metodą knock-out, czy z obniżoną ich liczbą metodą antysensowych nukleotydów, wykazują zwiększoną analgezję wywołaną stresem [28]. Wydaje się więc, że endogenna N/OFQ „kontroluje“ analgetyczne działanie endogennych peptydów opioidowych. Ponadto pronocyceptywne działanie N/OFQ nie jest odwracane przez nalokson [65], ale jest hamowane przez benzoilohydrazon naloksonu, który chemicznie jest pochodną nie-selektywnego antagonisty receptorów opioidowych – naloksonu i jest antagonistą receptorów NOP [1].

Rossi i wsp. [65] wykazali, że N/OFQ podana *icv* wywołuje u myszy działanie dwufazowe w teście bólowym „usuwania ogona“ (tail-flick). W pierwszej fazie występuje zwiększona wrażliwość zwierząt na ból, a w drugiej działanie analgetyczne. Jednocześnie wykazano, że krótsze fragmenty N/OFQ, tj N/OFQ (1-11) i N/OFQ (1-7) działają analgetycznie [65]. W rdzeniu kręgowym N/OFQ jest rozkładana z udziałem konwertaz do dwóch krótszych peptydów, N/OFQ (1-11) oraz N/OFQ (1-6) [68]. Badania prowadzone w Zakładzie Farmakodynamiki w Lublinie przy współpracy z Zakładem Neurochemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wykazały, że krótsze fragmenty N/OFQ mają aktywność biologiczną. I tak np. N/OFQ(1-6) wykazuje działanie analgetyczne w pierwszej fazie testu „usuwania ogona“ u szczurów (pierwsze 20 min obserwacji), a później następuje hiperalgezja (następne 30 min). Jest to przeciwne do działania pełnej sekwencji N/OFQ. Można przypuszczać, że za dwufazowe efekty pełnej sekwencji N/OFQ są odpowiedzialne krótsze fragmenty powstałe wskutek degradacji tego peptydu przez konwertazy [30, 68]. Co ciekawsze, antagonistą receptorów opioidowych - nalokson odwracał analgetyczne działanie fragmentu N/OFQ (1-6), ale nie wpływał na hiperalgezję. Hiperalgezja, lecz nie analgezja, była odwracana przez antagonistów receptora kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA), tj. niekompetytywnego antagonistę tego receptora, związek MK-801 czy antagonistę miejsca glicynowego w tym receptorze, związek L-701.324 [68]. Uzyskane wyniki mogą sugerować, iż w działaniu fragmentów N/OFQ włączone są różne receptory.

### N/OFQ A UZALEŻNIENIA LEKOWE

Drugim charakterystycznym skutkiem działania opioidów jest występowanie uzależnienia po długotrwałym ich stosowaniu. N/OFQ podawana przewlekle nie uzależnia zwierząt [29], natomiast podana szczurom uzależnionym od morfiny hamuje objawy abstynencji morfinowej (wywołane naloksonem) w postaci potrząsania całego ciała (wet dog shakes) [29]. Podobnie syntetyczny agonista receptorów NOP, związek Ro 64-6198, podany dootrzewnowo, hamuje objawy abstynencji morfinowej u myszy w postaci wyskoków z platformy (jumping) [33]. Powyższym efektom towarzyszyły objawy zaburzenia koordynacji ruchowej zwierząt, co mogło w dużej mierze wpływać na interpretację danych. Istnieją również doniesienia, iż antagonistą receptora NOP – związek J-113397 zmniejszał objawy abstynencji morfinowej u myszy [71]. Co ciekawsze, Malin i wsp. [41] wykazali, że pojedyncze ostre podanie N/OFQ do trzeciej komory mózgu powoduje morfinopodobny zespół objawów abstynencji u szczurów. Jednakże Ueda i wsp. [71] obserwowali słabsze objawy abstynencji morfinowej u myszy pozbawio-

nych receptorów NOP metodą knock-out, natomiast Kest i wsp. [26] zwiększoną wartość ED(50) morfiny (2–3-krotnie) oraz silniejsze objawy abstynencji. Tak więc wyniki badań nad udziałem receptorów NOP w uzależnieniu od morfiny wykazują duże zróżnicowanie. Kest i wsp. [26] stwierdzili natomiast, że receptor NOP nie odgrywa znaczącej roli w rozwoju tolerancji morfinowej.

Jednym z biochemicznym markerów uzależnienia morfinowego jest zwiększenie aktywności hydroksylazy tyrozynowej, obniżonej po podaniu N/OFQ do komory bocznej mózgu [70]. Długotrwałe podawanie N/OFQ zwiększa poziom represora genu kodującego hydroksylazę tyroksynową Oct-2, niezależnie od obecności lub braku morfiny [70]. Na podstawie obecnego stanu badań wydaje się, że N/OFQ bierze udział w uzależnieniu od morfiny, chociaż być może jej rola nie jest najważniejsza.

### N/OFQ A NAGRADZAJĄCE DZIAŁANIE RÓŻNYCH SUBSTANCJI

Trzecim charakterystycznym działaniem opioidów jest działanie nagradzające, które u ludzi jest związane ze stanem dobrego samopoczucia (euforii). Euforia zachęca do ponownego przyjęcia substancji i prowadzi do uzależnienia. Działanie nagradzające substancji jest mierzone u zwierząt testami warunkowej preferencji miejsca, różnicowania związków (drug-discrimination) czy samopobierania (self-administration) substancji. W przeciwieństwie do morfiny czy też endogennych peptydów opioidowych, zarówno N/OFQ, jak i Ro 64-6198 nie działają nagradzająco w teście preferencji miejsca [9, 35]. Jednakże N/OFQ znosi nagradzające działanie morfiny badane w teście warunkowej preferencji miejsca [5, 52]. Co więcej, wykonane w naszym Zakładzie badania wykazały, iż N/OFQ zapobiega również ekspresji preferencji miejsca indukowanej kokainą [31] oraz akwizycji preferencji miejsca indukowanej amfetaminą [32]. N/OFQ, podobnie jak Ro 64-6198, w istotny sposób zmniejsza nabywanie, ekspresję i odnowę (reinstatement) wcześniej nabytych właściwości nagradzających etanolu w teście preferencji [4, 34].

Sensytyzacja jest zjawiskiem charakterystycznym dla związków psychopobudzających (kokaina, amfetamina) oraz substancji uzależniających, takich jak morfina, etanol czy nikotyna. Sensytyzacja jest związana ze zwiększeniem behawioralnej odpowiedzi na lek (substancję) po jego parokrotnym podaniu [25]. Zjawisko sensytyzacji występuje nawet po dłuższym czasie od odstawienia tych substancji i jest przyczyną wystąpienia u ludzi nieprzeartej chęci ich spożycia czy powrotu do ich nadużywania [64]. U zwierząt sensytyzacja mierzona jest w teście ruchliwości czy stereotypii. N/OFQ nie wpływa na powstawanie indukowanej morfiną sensytyzacji w teście aktywności lokomotorycznej u szczurów [5]. Jednakże pojedyncze lub wielokrotne podanie N/OFQ powoduje rozwój sensytyzacji na ostre podanie kokainy [54, 55]. Ponadto zaobserwowano, że N/OFQ zapobiega powstaniu sensytyzacji na działanie psychostymulujące amfetaminy w teście stereotypii [32].

N/OFQ ma również wpływ na spożywanie substancji wywołujących uzależnienie. Wykazano, że przewlekle podanie N/OFQ zmniejsza spożycie alkoholu u szczurów pre-



ferujących etanol [4], ale nie wpływało na samopobieranie heroiny u szczurów [74].

Główny mechanizm działania nagradzającego opioidów, etanolu i psychostymulantów zależy od zwiększonego przekazywania dopaminergicznego w układzie mezolimbicznym [6]. Opioidy nasilają aktywność dopaminy (DA) poprzez stymulowanie receptorów opioidowych  $\mu$  umiejscowionych na interneuronach GABA-ergicznym w obszarze brzusznej części nakrywy mostu [23, 24]. Neurony GABA-ergiczne fizjologicznie hamują aktywność neuronów dopaminergicznym, które z kolei biegną do innych struktur układu limbicznego, takich jak jądro połączone przegrody [24]. Po podaniu morfiny obwodowo lub do brzusznej części nakrywy mostu, zwiększa się poziom DA w rdzeniu jądra połączonego przegrody, które jest główną strukturą zaangażowaną we wzmożenie pozytywne i działanie nagradzające substancji [12, 24]. N/OFQ podana do komory bocznej mózgu istotnie obniża pozakomórkowe stężenie DA w jądrze połączonego przegrody, a jednocześnie zwiększa stężenie GABA i glutamianu w tej strukturze [51].

N/OFQ wpływa na aktywność neuronów dopaminergicznym, ale nie jest do końca pewne, czy działa bezpośrednio, czy też pośrednio. Aby to wyjaśnić, zbadano dystrybucję mRNA receptora NOP oraz peptydu N/OFQ w obszarze brzusznej części nakrywy mostu. mRNA receptora NOP jest obecny głównie w neuronach dopaminergicznym, podczas gdy mRNA peptydu N/OFQ jest obecny głównie w neuronach niedopaminergicznym (prawdopodobnie GABA) [56]. W związku z tym, N/OFQ może wpływać na aktywność neuronów dopaminergicznym, bezpośrednio działając na receptory NOP umiejscowione na neuronach dopaminergicznym [40, 56] lub zmniejszając uwalnianie DA w brzusznej części nakrywy mostu prawdopodobnie przez wpływ na interneurony GABA-ergiczne. Jednak nadal dokładny mechanizm oddziaływania N/OFQ na neuroprzekazywanie dopaminergiczne pozostaje niejasny [53, 81]. N/OFQ hamuje indukowany morfiną czy kokainą poziom DA w jądrze połączonego przegrody i być może ten mechanizm jest podstawą hamowania nagradzających efektów substancji czy zjawiska sensytyzacji [13, 14, 38]. Po podaniu do komory bocznej mózgu, N/OFQ hamuje

również uwalnianie DA w prążkowie [15]. Dyskusyjny jest natomiast wpływ N/OFQ na białko transportera DA – (DA transporter – DAT). Istnieją publikacje potwierdzające hamowanie aktywności tego białka przez N/OFQ [36], ale również dostępne są wyniki sugerujące brak wpływu N/OFQ na to białko [61]. Trudno więc jednoznacznie stwierdzić, czy mechanizm ten odgrywa rolę w działaniu N/OFQ.

## PODSUMOWANIE

1. N/OFQ nie wiąże się z receptorami opioidowymi ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ).
2. Opioidowe peptydy nie aktywują receptorów NOP, podczas gdy N/OFQ jest ligandem NOP.
3. Komórkowe działanie N/OFQ nie jest odwracane przez antagonistę receptorów opioidowych – nalokson.
4. Neuroanatomiczna dystrybucja N/OFQ i jej receptorów różni się od dystrybucji opioidowych peptydów i ich receptorów.
5. Blokowanie opioidowej analgezji przez podanie N/OFQ do komory bocznej mózgu może sugerować jej funkcjonalnie antyopiodowy charakter w kontroli procesów nocyceptynowych.
6. Hamowanie objawów abstynencji morfinowej przez N/OFQ może mieć charakter nieopiodowy.

**Wniosek ogólny:** Receptory NOP są umiejscowione głównie na zakończeniach neuronów presynaptycznym w wielu strukturach mózgu, wpływają na uwalnianie wielu neuroprzekazywaczy i w ten sposób biorą udział w regulacji licznych procesów fizjologicznym. Jeśli chodzi o układ opiodowy, wydaje się, że N/OFQ pełni raczej rolę neuromodulatora aniżeli funkcjonalnego antagonisty działania opiodów. Obecnie farmakologiczne zastosowanie N/OFQ wymaga dalszym badań. Istnieją jednak przesłanki, że w przyszłości agonisci receptora NOP mogą znaleźć zastosowanie w terapii bólu, uzależnień lekowych czy jako związki o działaniu anksjolitycznym.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Bigoni R., Cao G., Rizzi A., Okawa H., Regoli D., Smart D., Lambert D.G.: Effects of naloxone benzoylhydrazone on native and recombinant nociceptin/orphanin FQ receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2002; 80: 407-412
- [2] Calo' G., Guerrini R., Rizzi A., Salvadori S., Regoli D.: Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. *Br. J. Pharmacol.*, 2000; 129: 1261-1283
- [3] Candelletti S., Ferri S.: Effects of an antisense oligonucleotide to pronociceptin and long-term prevention of morphine actions by nociceptin. *Peptides*, 2000; 21: 1119-1124
- [4] Ciccocioppo R., Panocka I., Polidori C., Regoli D., Massi M.: Effect of nociceptin on alcohol intake in alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology*, 1999; 141: 220-224
- [5] Ciccocioppo R., Angeletti S., Sanna P.P., Weiss F., Massi M.: Effect of nociceptin/orphanin FQ on the rewarding properties of morphine. *Eur. J. Pharmacol.*, 2000; 404: 153-159
- [6] Ciccocioppo R., Angeletti S., Panocka I., Massi M.: Nociceptin/orphanin FQ and drugs of abuse. *Peptides*, 2000; 21: 1071-1080
- [7] Citterio F., Corradini L., Smith R.D., Bertorelli R.: Nociceptin attenuates opioid and gamma-aminobutyric acid (B) receptor-mediated analgesia in the mouse tail-flick assay. *Neurosci. Lett.*, 2000; 292: 85-86
- [8] Cox B.M., Chavkin C., Christie M.J.: Opioid receptors. W: Girdlestone D. (ed) *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*. IUPHAR Media Ltd., London, 2000; 321-333
- [9] Devine D.P., Reinscheid R.K., Monsma F.J.Jr., Civelli O., Akil H.: The novel neuropeptide orphanin FQ fails to produce conditioned place preference or aversion. *Brain Res.*, 1996; 727: 225-229
- [10] Devine D.P., Taylor L., Reinscheid R.K., Monsma F.J.Jr., Civelli O., Akil H.: Rats rapidly develop tolerance to the locomotor-inhibiting effects of the novel neuropeptide orphanin FQ. *Neurochem. Res.*, 1996; 21: 1387-1396
- [11] Devine D.P., Watson S.J., Akil H.: Nociceptin/orphanin FQ regulates neuroendocrine function of the limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience*, 2001; 102: 541-553

- [12] Di Chiara G., Imperato A.: Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1988; 244: 1067-1080
- [13] Di Giannuario A., Pieretti S., Catalani A., Loizzo A.: Orphanin FQ reduces morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens: a microdialysis study in rats. *Neurosci. Lett.*, 1999; 272: 183-186
- [14] Di Giannuario A., Pieretti S.: Nociceptin differentially affects morphine-induced dopamine release from the nucleus accumbens and nucleus caudate in rats. *Peptides*, 2000; 21: 1125-1130
- [15] Flau K., Redmer A., Liedtke S., Kathmann M., Schlicker E.: Inhibition of striatal and retinal dopamine release via nociceptin/orphanin FQ receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 2002; 137: 1355-1361
- [16] Griebel G., Perrault G., Sanger D.J.: Orphanin FQ, a novel neuropeptide with anti-stress-like activity. *Brain Res.*, 1999; 856: 221-224
- [17] Grisel J.E., Mogil J.S., Belknap J.K., Grandy D.K.: Orphanin FQ acts as a supraspinal, but not a spinal, anti-opioid peptide. *Neuroreport*, 1996; 7: 2125-2129
- [18] Hamon M.: The new approach to opioid receptors. *NS Arch. Pharmacol.*, 1998; 358(Suppl 2): SA 5.3
- [19] Hao J.X., Wiesenfeld-Hallin Z., Xu X.J.: Lack of cross-tolerance between the antinociceptive effect of intrathecal orphanin FQ and morphine in the rat. *Neurosci. Lett.*, 1997; 223: 49-52
- [20] Heinricher M.M., McGaraughty S., Grandy D.K.: Circuitry underlying antioioid actions of orphanin FQ in the rostral ventromedial medulla. *J. Neurophysiol.*, 1997; 78: 3351-3358
- [21] Houtani T., Nishi M., Takeshima H., Nukada T., Sugimoto T.: Structure and regional distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996; 219: 714-719
- [22] Jenck F., Wichmann J., Dautzenberg F.M., Moreau J.L., Ouagazzal A.M., Martin J.R., Lundstrom K., Cesura A.M., Poli S.M., Roever S., Kolczewski S., Adam G., Kilpatrick G.: A synthetic agonist at the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL1: anxiolytic profile in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 4958-4943
- [23] Johnson S.W., North R.A.: Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J. Neurosci.*, 1992; 12: 483-488
- [24] Johnson S.W., North R.A.: Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J. Physiol.*, 1992; 450: 455-468
- [25] Kalivas P.W., Stewart J.: Dopamine transmission in the initiation and expression of drugs and stress induced sensitization. *Brain Res. Rev.*, 1991; 16: 223-224
- [26] Kest B., Hopkins E., Palmese C.A., Chen Z.P., Mogil J.S., Pinter J.E.: Morphine tolerance and dependence in nociceptin/orphanin FQ transgenic knock-out mice. *Neuroscience*, 2001; 104: 217-222
- [27] Konya H., Masuda H., Itoh K., Nagai K., Kakishita E., Matsuoka A.: Modification of dopamine release by nociceptin in conscious rat striatum. *Brain Res.*, 1998; 788: 341-344
- [28] Koster A., Montkowski A., Schulz S., Stube E.M., Knaut K., Jenck F., Moreau J.L., Nothacker H.P., Civelli O., Reinscheid R.K.: Targeted disruption of the orphanin FQ/nociceptin gene increases stress susceptibility and impairs stress adaptation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 10444-10449
- [29] Kotlinska J., Suder P., Legowska A., Rolka K., Silberring J.: Orphanin FQ/nociceptin inhibits morphine withdrawal. *Life Sci.*, 2000; 66: PL119-123
- [30] Kotlinska J., Suder P., Sciubisz A., Legowska A., Eilmes J., Rolka K., Silberring J.: C-Terminal glycine is crucial for hyperalgesic activity of nociceptin/orphanin FQ-(1-6). *Eur. J. Pharmacol.*, 2001; 419: 33-37
- [31] Kotlinska J., Wichmann J., Legowska A., Rolka K., Silberring J.: Orphanin FQ/nociceptin but not Ro 65-6570 inhibits the expression of cocaine-induced conditioned place preference. *Behav. Pharmacol.*, 2002; 13: 229-235
- [32] Kotlinska J., Rafalski P., Biala G., Dylag T., Rolka K., Silberring J.: Orphanin FQ/Nociceptin inhibits acquisition of amphetamine-induced conditioned place preference and development of sensitization to stereotypy in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 2003; 474: 233-239
- [33] Kotlinska J., Wichmann J., Rafalski P., Talarek S., Dylag T., Silberring J.: Non-peptidergic OP4 receptor agonist inhibits morphine antinociception but does not influence morphine dependence. *Neuroreport*, 2003; 14: 601-604
- [34] Kuzmin A., Sandin J., Terenius L., Ogren S.O.: Acquisition, expression, and reinstatement of ethanol-induced conditioned place preference in mice: effects of opioid receptor-like 1 receptor agonists and naloxone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003; 304: 310-318
- [35] Le Pen G., Wichmann J., Moreau J.L., Jenck F.: The orphanin receptor agonist RO 64-6198 does not induce place conditioning in rats. *Neuroreport*, 2002; 13: 451-454
- [36] Liu Z., Wang Y., Zhang J., Ding J., Guo L., Cui D., Fei J.: Orphanin FQ: an endogenous antagonist of rat brain dopamine transporter. *Neuroreport*, 2001; 12: 699-702
- [37] Lutfy K., Sharza S.A., Maidment N.T.: Tolerance develops to the inhibitory effect of orphanin FQ on morphine-induced antinociception in the rat. *Neuroreport*, 1999; 10: 103-106
- [38] Lutfy K., Do T., Maidment N.T.: Orphanin FQ/nociceptin attenuates motor stimulation and changes in nucleus accumbens extracellular dopamine induced by cocaine in rats. *Psychopharmacology*, 2001; 154: 1-7
- [39] Lutfy K., Hossain S.M., Khaliq I., Maidment N.T.: Orphanin FQ/nociceptin attenuates the development of morphine tolerance in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 2001; 134:529-534
- [40] Maidment N.T., Chen Y., Tan A.M., Murphy N.P., Leslie F.M.: Rat ventral midbrain dopamine neurons express the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL-1. *Neuroreport*, 2002; 13: 1157-1140
- [41] Malin D.H., Lake J.R., Moon W.D., Moy D., Montellano A.L., Moy E., Campbell T.D., Bell M.V., Bryant D., Harrison L.M., Grandy D.K.: Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) induces a quasi-morphine abstinence syndrome in the rat. *Psychopharmacology*, 2000; 151: 344-350
- [42] Meunier J.C., Mollereau C., Toll L., Suadeau C., Moisan C., Alvinerie P., Butour J.L., Guillemot J.C., Ferrara P., Monsarrat B.: Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*, 1995; 377: 532-535
- [43] Meunier J.C., Mouldous L., Topham C.M.: The nociceptin (ORL1) receptor: molecular cloning and functional architecture. *Peptides*, 2000; 21: 893-900
- [44] Mogil J.S., Grisel J.E., Zhangs G., Belknap J.K., Grandy D.K.: Functional antagonism of mu-, delta- and kappa-opioid antinociception by orphanin FQ. *Neurosci. Lett.*, 1996; 214: 131-134
- [45] Mogil J.S., Grisel J.E., Reinscheid R.K., Civelli O., Belknap J.K., Grandy D.K.: Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience*, 1996; 75: 333-337
- [46] Mogil J.S., Pasternak G.W.: The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. *Pharmacol. Rev.*, 2001; 53: 381-415
- [47] Mollereau C., Parmentier M., Mailleux P., Butour J.L., Moisan C., Chalou P., Caput D., Vassart T.G., Meunier C.: ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.*, 1994; 341: 33-38
- [48] Mollereau C., Simons M.J., Soularue P., Liners F., Vassart G., Meunier J.C., Parmentier M.: Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 8666-8670
- [49] Moran T.D., Abdulla F.A., Smith P.A.: Cellular neurophysiological actions of nociceptin/orphanin FQ. *Peptides*, 2000; 21: 969-976
- [50] Morgan M.M., Grisel J.E., Robbins C.S., Grandy D.K.: Antinociception mediated by the periaqueductal gray is attenuated by orphanin FQ. *Neuroreport*, 1997; 8: 3431-3434
- [51] Murphy N.P., Ly H.T., Maidment N.T.: Intracerebroventricular orphanin FQ/nociceptin suppresses dopamine release in the nucleus accumbens of anaesthetized rats. *Neuroscience*, 1996; 75: 1-4
- [52] Murphy N.P., Lee Y., Maidment N.T.: Orphanin FQ/nociceptin blocks acquisition of morphine place preference. *Brain Res.*, 1999; 832:168-170
- [53] Murphy N.P., Maidment N.T.: Orphanin FQ/nociceptin modulation of mesolimbic dopamine transmission determined by microdialysis. *J. Neurochem.*, 1999; 73: 179-186
- [54] Narayanan S., Maidment N.T.: Orphanin FQ and behavioral sensitization to cocaine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1999; 63: 271-277
- [55] Narayanan S., Lutfy K., Maidment N.: Sensitization to cocaine after a single intra-cerebral injection of orphanin FQ/nociceptin. *Behav. Brain Res.*, 2002; 131: 97-103
- [56] Norton C.S., Neal C.R., Kumar S., Akil H., Watson S.J.: Nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor-like receptor mRNA expression in dopamine systems. *J. Comp. Neurol.*, 2002; 444: 358-368
- [57] Okuda-Ashitaka E., Tachibana S., Houtani T., Minami T., Masu Y., Nishi M., Takeshima H., Sugimoto T., Ito S.: Identification and characterization of an endogenous ligand for opioid receptor homologue ROR-C: its involvement in allodynic response to innocuous stimulus. *Mol. Brain Res.*, 1996; 43: 96-104

- [58] Pan Z., Hirakawa N., Fields H.L.: A cellular mechanism for the bidirectional pain-modulating actions of orphanin FQ/nociceptin. *Neuron*, 2000; 26: 515-522
- [59] Patel H.J., Giembycz M.A., Spicuzza L., Barnes P.J., Belvisi M.G.: Naloxone-insensitive inhibition of acetylcholine release from parasympathetic nerves innervating guinea-pig trachea by the novel opioid, nociceptin. *Br. J. Pharmacol.*, 1997; 120: 735-736
- [60] Pomonis J.D., Billington C.J., Levine A.S.: Orphanin FQ, agonist of orphan opioid receptor ORL1, stimulates feeding in rats. *Neuroreport*, 1996; 8: 369-371
- [61] Prasad B.M., Amara S.G.: The dopamine transporter in mesencephalic cultures is refractory to physiological changes in membrane voltage. *J. Neurosci.*, 2001; 21: 7561-7567
- [62] Reinscheid R.K., Nothacker H.P., Bourson A., Ardati A., Henningsen R.A., Bunzow J.R., Grandy D.K., Langen H., Monsma F.J., Jr., Civelli O.: Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*, 1995; 270: 792-794
- [63] Riedl M., Shuster S., Vulchanova L., Wang J., Loh H.H., Elde R.: Orphanin FQ/nociceptin-immunoreactive nerve fibers parallel those containing endogenous opioids in rat spinal cord. *Neuroreport*, 1996; 7: 1369-1372
- [64] Robinson T.E., Berridge K.C.: The neuronal basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Rev.*, 1993; 18: 247-291
- [65] Rossi G.C., Leventhal L., Bolan E., Pasternak G.W.: Pharmacological characterization of orphanin FQ/nociceptin and its fragments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997; 282: 858-865
- [66] Sandin J., Georgieva J., Schott P.A., Ogren S.O., Terenius L.: Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats. *Eur. J. Neurosci.*, 1997; 9: 194-197
- [67] Schulz S., Schreff M., Nuss D., Gramsch C., Holtt V.: Nociceptin/orphanin FQ and opioid peptides show overlapping distribution but not co-localization in pain-modulatory brain regions. *Neuroreport*, 1996; 7: 3021-3025
- [68] Suder P., Kotlińska J., Smoluch M.T., Sallberg M., Silberring J.: Metabolic fate of nociceptin/orphanin FQ in the rat spinal cord and biological activity of its released fragment. *Peptides*, 1999; 20: 239-247
- [69] Terenius L., Sandin J., Sakurada T.: Nociceptin/orphanin FQ metabolism and bioactive metabolites. *Peptides*, 2000; 21: 919-922
- [70] Thakker D.R., Standifer K.M.: Orphanin FQ/nociceptin blocks chronic morphine-induced tyrosine hydroxylase upregulation. *Mol. Brain Res.*, 2002; 105: 38-46
- [71] Ueda H., Inoue M., Takeshima H., Iwasawa Y.: Enhanced spinal nociceptin receptor expression develops morphine tolerance and dependence. *J. Neurosci.*, 2000; 20: 7640-7647
- [72] Vaughan C.W., Ingram S.L., Christie M.J.: Actions of the ORL1 receptor ligand nociceptin on membrane properties of rat periaqueductal gray neurons *in vitro*. *J. Neurosci.*, 1997; 17: 996-1003
- [73] Wagner E.J., Ronnekleiv O.K., Grandy D.K., Kelly M.J.: The peptide orphanin FQ inhibits beta-endorphin neurons and neurosecretory cells in the hypothalamic arcuate nucleus by activating an inwardly-rectifying K<sup>+</sup> conductance. *Neuroendocrinology*, 1998; 67: 73-82
- [74] Walker J.R., Spina M., Terenius L., Koob G.F.: Nociceptin fails to affect heroin self-administration in the rat. *Neuroreport*, 1998; 9: 2243-2247
- [75] Xu X.J., Hao J.X., Wiesenfeld-Hallin Z.: Nociceptin or antinociceptin: potent spinal antinociceptive effect of orphanin FQ/nociceptin in the rat. *Neuroreport*, 1996; 7: 2092-2094
- [76] Yu T.P., Fein J., Phan T., Evans C.J., Xie C.W.: Orphanin FQ inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat hippocampus. *Hippocampus*, 1997; 7: 88-94
- [77] Yu T.P., Xie C.W.: Orphanin FQ/nociceptin inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat dentate gyrus through postsynaptic mechanisms. *J. Neurophysiol.*, 1998; 80: 1277-1284
- [78] Yuan L., Han Z., Chang J.K., Han J.S.: Accelerated release and production of orphanin FQ in brain of chronic morphine tolerant rats. *Brain Res.*, 1999; 826: 330-334
- [79] Zadina J.E., Hackler L., Ge L.-J., Kastin A.J.: A potent and selective endogenous agonist for the m-opiate receptor. *Nature*, 1997; 386: 499-502
- [80] Zaveri N.: Peptide and nonpeptide ligands for the nociceptin/orphanin FQ receptor ORL1: Research tool and potential therapeutic agents. *Life Sci.*, 2003; 73: 663-678
- [81] Zheng F., Grandy D.K., Johnson S.W.: Actions of orphanin FQ/nociceptin on rat ventral tegmental area neurons *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, 2002; 136: 1065-1071