

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE MEDICHE VETERINARIE

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H4

Settore Scientifico disciplinare: VET/08

Farmacocinetica della buprenorfina, e del suo
metabolita norbuprenorfina, somministrata
come infusione costante nel periodo post-
operatorio in cagne sane sottoposte ad
ovariectomia

Presentata da: Valgimigli dott. Simond

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Famigli Bergamini Paolo

Prof.sa Capitani Ombretta

Esame finale anno 2013

INDICE

DOLORE

DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE - pag. 4

CENNI DI FISIOPATOLOGIA - pag.5

FASI E FARMACI CORRELATI - pag.5

Trasduzione - pag.5

Trasmissione - pag.6

Modulazione a livello di corna dorsali del midollo spinale - pag.7

Modulazione soprasegmentale - pag.8

Proiezione - pag.9

Percezione - pag.10

SENSIBILIZZAZIONE E FARMACI CORRELATI - pag.10

Sensibilizzazione periferica - pag.11

Sensibilizzazione centrale - pag.12

DOLORE E STRESS - pag.15

INDICATORI COMPORTAMENTALI - pag.15

COMPONENTI BIOLOGICHE - pag.16

Sistema nervoso autonomo - pag.16

Asse neuroendocrino - pag.17

Metabolismo - pag.18

Sistema Immunitario - pag.19

Cambiamenti morfologici - pag.20

BUPRENORFINA

CARATTERISTICHE E MECCANISMO D'AZIONE - pag.21

CINETICA - pag.24

PARTE SPERIMENTALE

OBBIETTIVO DELLO STUDIO - pag.29

MATERIALI E METODI - pag.30

ANIMALI - pag.30

PROTOCOLLO ANESTESIOLOGICO E MONITORAGGI - pag.30

METODICA ANALITICA - pag.32

Campioni di plasma - pag.32

Prodotti chimici - pag.32

Strumentazione - pag.32

Sistema UPLC-MS/MS - pag.33

Condizioni cromatografiche - pag.33

Condizioni MS/MS - pag.33

Altre strumentazioni - pag.35

Soluzioni di rinforzo e standard interni - pag.35

Estrazione degli analiti dal plasma - pag.36

Validazione - pag.37

Linearità - pag.37

Accuratezza - pag.37

Limite di quantificazione - pag.37

RISULTATI - pag.38

GRAFICI - pag.39

BIBLIOGRAFIA

DOLORE

DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONI

Per "dolore" si intende un'esperienza sensoriale ed emotiva associata ad un effettivo o potenziale danno tissutale; tale esperienza è di natura soggettiva e solitamente associata a sensazioni quali paura, ansia o panico. Convenzionalmente, il dolore viene classificato come acuto e cronico. Il dolore acuto è quello evocato da uno stimolo infiammatorio di natura traumatica, chirurgica o infettiva, ad insorgenza improvvisa e relativamente di breve durata. Esso ha una funzione biologica precisa, ovvero quella di segnalare un pericolo per l'organismo ed attivare appropriati meccanismi di difesa, sia motori che comportamentali (es. la retrazione improvvisa di un arto, la fuga o qualsivoglia azione atta all'interruzione immediata dello stimolo). Il dolore cronico, invece, rappresenta indubbiamente un campo di studio più insidioso, in quanto avente diverse e complesse eziopatogenesi, segni clinici più subdoli ed ardua gestione terapeutica. Tale viene definito il dolore che persiste oltre la normale durata dell'evento che lo ha scatenato, o associato a processi patologici persistenti o ricorrenti nel corso di mesi o anni (es. osteoartriti). Contrariamente al dolore acuto, quello cronico non ha alcuna funzione biologica, e mentre il primo può essere considerato come sintomo di una patologia, quest'ultimo rappresenta esso stesso un processo patologico. In quanto percezione, il dolore è sempre da considerarsi come soggettivo. In medicina umana vengono descritte tre dimensioni legate al dolore: sensoriale-discriminativa, motivazionale-affettiva e cognitiva-valutativa. Per esperienza sensoriale-discriminativa si intende, la percezione dell'insorgenza, la localizzazione, l'intensità, il tipo e la durata dello stimolo nocicettivo, veicolata principalmente dai fasci spinali nocicettivi laterali ascendenti sino al talamo ed elaborata dalla corteccia somatosensitiva. La dimensione motivazionale-affettiva rappresenta un turbamento del benessere dell'individuo, risultante in una spiacevole esperienza di dolore e sofferenza, la quale induce l'organismo ad agire di conseguenza. Questa è strettamente

legata al sistema nervoso autonomo e le risposte cardiovascolari, respiratorie, gastrointestinali ed endocrine ad esso associate, veicolata dai fasci spinali nocicettivi mediali ascendenti sino a quei distretti encefalici che sino a qualche anno fa venivano inclusi nel Sistema Limbico. L'esperienza cognitiva-valutativa comprende le conseguenze delle precedenti esperienze, concezioni sociali e popolari, ansia, attenzione e condizionamento; tutte attività svolte a livello corticale su attivazione reticolare. Quest'ultima dimensione potrebbe costituire l'unica sostanziale differenza tra gli umani e gli altri mammiferi.

CENNI DI FISIOPATOLOGIA DEL DOLORE

FASI E FARMACI CORRELATI

La nocicezione rappresenta un processo sensoriale alquanto complesso, convenzionalmente suddiviso, su base anatomica e fisiologica, in cinque fasi fondamentali: Trasduzione, Trasmissione, Modulazione, Proiezione e Percezione.

Trasduzione

Il processo di trasduzione avviene a livello periferico ad opera di terminazioni nervose libere a funzione recettoriale, la cui depolarizzazione è innescata, per la maggior parte, da ioni sodio e calcio in entrata attraverso canali ionici non selettivi, attivati da stimoli meccanici, termici e chimici. Tali canali ionici appartengono essenzialmente a due famiglie: TRP e TREK-1, differentemente diffuse sui vari tipi di terminazioni. Presenza, specificità e soglia di tali recettori costituiscono un primo importante "filtro nocicettivo" e caratterizzano le differenti classi di fibre afferenti primarie, molte delle quali

polimodali, ovvero attivate da differenti tipi di stimoli, mentre altre vengono definite unimodali, in quanto rispondenti ad un solo tipo di stimolazione. E' proprio a livello recettoriale che si gioca la grande partita della cosiddetta "sensibilizzazione primaria". Si tratta, in sintesi, di un aumento della conduttanza di membrana sostenuta da enzimi attivati da uno stimolo nocicettivo persistente o particolarmente intenso, meccanismo per cui, in sostanza, il dolore percepito è di entità ed estensione maggiori rispetto al dovuto. A parte la desensibilizzazione periferica tramite cloruro di etile, ad oggi esistono in commercio poche molecole agenti su tali recettori, la più importante delle quali è la Capsaicina, utilizzata in medicina umana assieme ai suoi analoghi prevalentemente in preparazioni topiche. Attualmente alcune tra le più rinomate industrie farmaceutiche stanno investendo fondi per la sperimentazione clinica di antagonisti TRPV1.

Trasmissione

La trasmissione del potenziale instauratosi a livello terminale avviene lungo fibre nervose afferenti primarie dei neuroni pseudounipolari con soma localizzato a livello di gangli spinali paravertebrali. La depolarizzazione progressiva di tali fibre avviene ad opera di canali del sodio voltaggio dipendenti, divisi in vari tipi ed isoforme. Tra i tipi principali, vale la pena citare i tetrodotossina sensibili (TTX-S), espressi in condizioni fisiologiche, e quelli resistenti (TTX-R), a minor conduttanza per il sodio, maggiormente espressi in condizioni di danno nervoso, flogosi o esposizione a sostanze algogeniche. Le afferenze nocicettive primarie si dividono principalmente in $A\delta$ (di tipo I e II) e c. Le fibre $A\delta$ sono quelle a maggior diametro, mieliniche, per cui dotate di una velocità di conduzione nettamente superiore, aventi recettori specifici e campi recettoriali poco estesi, motivo per cui veicolano il cosiddetto "primo dolore", localizzato, puntiforme e transitorio, mentre le c, polimodali e maggiormente diffuse (cute, visceri), sono amieliniche, a più lenta conduzione, di diametro inferiore e posseggono campi recettivi più

ampi, caratterizzando così la percezione del "secondo dolore", ovvero una sensazione di bruciore o di morso estremamente poco localizzata. I classici farmaci che inibiscono la fase di trasmissione nocicettiva sono gli anestetici locali, ovvero bloccanti dei canali del sodio, altamente impiegati, anche in medicina veterinaria, come parte di protocolli anestetici ed analgesici multimodali. Il limite di tali molecole è, purtroppo, la totale assenza di selettività e quindi un indice terapeutico alquanto ristretto, pertanto sono in corso studi riguardo isoforme specifiche per i recettori implicati nella trasmissione nocicettiva e ricerche nell'ambito della terapia genica.

Modulazione a livello di corna dorsali del midollo spinale

La fase di modulazione spinale avviene a livello di sostanza grigia, precisamente in quelle porzioni di corna dorsali costituite dalle lamine I, II, IIa e V e vede il glutammato come neurotrasmettitore principalmente coinvolto. A questo livello i neuroni sensitivi primari entrano in rapporto sinaptico con tre diverse tipologie di cellule, ovvero interneuroni (eccitatori o inibitori), neuroni propriospinali e neuroni di proiezione (deputati alla trasmissione dello stimolo a strutture sopraspinali). I recettori implicati nella trasmissione sinaptica a questo livello sono prevalentemente di tipo AMPA ed, in minor numero, NMDA, questi ultimi corresponsabili del processo di "sensibilizzazione centrale". I neuroni di proiezione delle corna dorsali vengono distinti in due classi principali: WDR (Wide Dynamic Range) e NS (Nociceptive-Specific). I primi, distribuiti soprattutto a livello di lamina V, ricevono sia afferenze nocicettive che non, hanno ampie aree recettoriali sia somatiche che viscerali (si pensa siano tra i responsabili del cosiddetto "dolore riferito"), reagiscono agli stimoli in maniera sommatória e graduale e sono probabilmente le cellule più importanti implicate nel processo di sensibilizzazione secondaria, o fenomeno del "wind up". Al contrario, i neuroni di tipo NS, concentrati soprattutto nella lamina I, ricevono esclusivamente input nocicettivi da aree sinaptiche minori, definendo così

localizzazione e discriminazione dello stimolo. I farmaci analgesici attivi a livello di corna dorsali sono essenzialmente oppioidi, α_2 agonisti ed antinfiammatori non steroidei. Gli oppioidi sono attualmente tra le molecole più efficaci per il controllo del dolore. Il loro legame con numerose popolazioni di recettori specifici a livello spinale induce effetti sia pre che post-sinaptici, pertanto essi sono in grado di inibire sia il rilascio di neurotrasmettitori da parte delle fibre afferenti primarie che l'attivazione dei neuroni di proiezione (tramite meccanismo di iperpolarizzazione), sia direttamente che tramite l'attivazione di interneuroni inibitori. Gli α_2 agonisti hanno un'azione del tutto simile, in quanto gli α_2 -adrenocettori a cui si legano appartengono alla stessa superfamiglia dei recettori per gli oppioidi. Gli antinfiammatori non steroidei inibiscono le varie famiglie di cicloossigenasi sia a livello di corna dorsali che nei distretti periferici, giocando un ruolo fondamentale nell'inibizione sia della trasmissione centrale dello stimolo nocicettivo che della sensibilizzazione periferica e centrale.

Modulazione soprasegmentale

L'attività delle vie nocicettive spinali è regolata da sistemi antinocicettivi sia *in situ*, sia originanti a livello di tronco encefalico, mesencefalo e strutture talamo-corticali. Trattasi di nuclei attivati dalle vie di proiezione ascendenti (in particolare quelle veicolanti il dolore profondo, come il tratto spinoreticolare), da cui originano fasci ascendenti diretti ad interneuroni inibitori o neuroni sensitivi secondari spinali. Tra i vari nuclei implicati in questo processo è doveroso citare il Grigio Periacqueduttale mesencefalico (PAG) ed il nucleo del rafe magno (RMN) del midollo rostro-ventrale. Il PAG riceve afferenze sia da vie ascendenti nocicettive che da nuclei della formazione reticolare, giro del cingolo, strutture un tempo incluse nel sistema limbico ed all'ipotalamo, e proietta al tronco encefalico. In risposta alla stimolazione da parte di queste strutture, le cellule del PAG liberano

endorfine (oppioidi endogeni) in grado di disinibire sia interneuroni inibitori a livello di tronco encefalico che le vie monoaminergiche bulbo-spinali (noradrenergiche e serotoninergiche) che modulano la trasmissione nocicettiva a livello spinale (corni dorsali). Il midollo rostro-ventrale è popolato da cellule cosiddette "on" ed "off". Entrambi i tipi cellulari reagiscono alla stimolazione diretta del tratto spino-talamico, le prime attivando la via parabrachiale, ipotalamica, cingolata, insulare e setto-ippocampale, al fine di amplificare il segnale nocicettivo ed innescare le tipiche reazioni avverse, mentre le altre si iperpolarizzano riducendo il segnale. Le molecole che agiscono stimolando le vie nocicettive discendenti sono gli oppioidi (con il medesimo meccanismo d'azione degli analoghi endogeni), e, probabilmente, anche gli α 2agonisti, i quali si legano a recettori presenti in nuclei catecolaminergici pontini (Locus Ceruleus) che ricevono afferenze dal PAG e proiettano a livello spinale, modulando in senso negativo la nocicezione.

Proiezione

Gran parte dei neuroni sensitivi secondari spinali proietta i propri assoni controlateralmente per poi formare i seguenti fasci ascendenti: il tratto spinotalamico, lo spinocervicotalamico, lo spinoreticolare, lo spinomesencefalico e la via postsinaptica della colonna dorsale, diretti alle rispettive aree di proiezione. L'importanza dei vari tratti nella proiezione delle informazioni nocicettive è variabile da una specie all'altra. Nei mammiferi domestici d'interesse clinico i fasci più importanti in tal senso sono essenzialmente lo spinotalamico e lo spinocervicotalamico, quest'ultimo di particolare rilievo nei carnivori. Ovviamente gli stessi farmaci in grado di regolare la modulazione hanno come effetto conseguente una riduzione della proiezione a livello sopraspinale.

Percezione

La percezione conscia del dolore si realizza attraverso una serie di legami sinaptici tra nuclei del talamo laterale e corteccia somatosensitiva primaria e secondaria, ovvero mediante quello che viene definito come sistema talamocorticale laterale, mentre la dimensione motivazionale ed affettiva viene gestita dal sistema talamocorticale mediale, ovvero nuclei del talamo mediale che proiettano al giro del cingolo anteriore, corteccia prefrontale, ipotalamo ed amygdala. Farmaci come oppioidi o α_2 agonisti agiscono anche a livello soprasspinale sia attivando le vie inibitorie discendenti che generando sedazione, e quindi modulando in qualche modo la percezione del dolore effettivo residuo, così come tutte le molecole sedative/ansiolitiche prive di attività analgesica intrinseca (benzodiazepine, anestetici generali, fenotiazine).

SENSIBILIZZAZIONE AL DOLORE E FARMACI CORRELATI

In ambito clinico, medici e veterinari sono spesso chiamati a gestire il dolore legato a traumi tissutali importanti. In corso di stimoli algici particolarmente intensi e/o reiterati si possono osservare alterazioni del sistema nocicettivo quali il dolore continuo, l'aumento di sensibilità agli stimoli algici (Iperalgesia) o addirittura la percezione di stimoli innocui (tattili, meccanici, termici) come dolorifici (Allodinia). Tali riscontri clinici sono il risultato di una serie di modificazioni, sia periferiche che centrali, a carico del sistema nocicettivo.

Sensibilizzazione periferica

Un danno tissutale genera un processo flogistico, provocando importanti alterazione a livello dei nocicettori periferici coinvolti. Le cellule

danneggiate rilasciano sostanze intracitoplasmatiche quali ATP e ioni potassio, si verifica un calo del pH locale e le cellule infiammatorie reclutate producono citochine, fattori di crescita e chemiotattici. Molte di queste sostanze agiscono sui recettori associati alla proteina G e TrK (Tyrosine-Kinase) presenti a livello di membrana dei nocicettori innescando una serie di vie enzimatiche intracellulari che ha come ultimo effetto la fosforilazione di recettori e canali ionici delle stesse terminazioni, ovvero modificandone sostanzialmente cinetica e soglia d'attivazione. I mediatori flogistici in questione possono essere sommariamente classificati come attivatori diretti o indiretti. Tra quelli diretti, alcuni vengono definiti attivanti, in quanto in grado di stimolare direttamente le terminazioni nervose, mentre altri, definiti sensibilizzanti, le rendono iper-responsive ad altri impulsi. Le Prostaglandine (PG) vengono considerate come tipiche molecole ad azione sensibilizzante, la PGE₂ ad esempio, attivando la Protein-Kinasi A cAMP-dipendente e la Protein-Kinasi C, induce la fosforilazione dei recettori TRPV1, abbassandone radicalmente la soglia d'attivazione termica (da circa 42° a 35°). Le Bradikinine invece fungono sia da attivatori che sensibilizzatori diretti in quanto, agendo attraverso vie enzimatiche multiple, sono in grado sia di diminuire sensibilmente la soglia termica d'attivazione dei recettori TRPV1 che attivando i TRPA1 PLC-dipendenti, responsabili della maggiore sensibilità dolorifica al freddo. Studi relativamente recenti dimostrano come i fattori neurotrofici, primo tra tutti il NGF, possano giocare un ruolo chiave nel meccanismo di sensibilizzazione periferica. Sebbene il contributo di tali fattori non sia ancora del tutto chiaro, sembrerebbe che il NGF, oltre a regolare la sopravvivenza delle cellule nervose, possa fungere da mediatore nocicettivo. Il NGF viene espresso precocemente nei tessuti coinvolti da un processo infiammatorio e raggiunge livelli elevati durante i processi cronici. I suoi recettori target sono il TrkA (Tyrosin-kinasi), fondamentale nel processo di nocicezione, e il p75 NTR, di ruolo meno importante. Come la PGE₂, il NGF è in grado di sensibilizzare i canali TRPV1 attraverso l'attivazione della PKC, ed assume un ruolo importante anche nella trasmissione retrograda, in quanto viene rilasciato dalle terminazioni nervose

ed induce sia la degranulazione mastocitaria che l'espressione cellulare di proteine quali la sostanza P, il BDNF ed i canali Nav 1.8, ASIC3 e TRPV1, le quali inducono un'ulteriore sensibilizzazione a livello di afferenze primarie, contribuendo al fenomeno di iperalgesia. Alla luce di tali dati, è chiaro come i farmaci antinfiammatori non steroidei, attraverso l'inibizione delle prostaglandine, siano utili per combattere la sensibilizzazione periferica. I limiti analgesici dei FANS attualmente disponibili sono essenzialmente l'effetto ceiling (effetto tetto) e l'azione sulla sola via delle COX, senza alterare la via delle bradichinine e del NGF, considerati, assieme al TrkA, target fondamentali di nuove molecole in via di sviluppo. Sebbene per anni siano stati considerati farmaci ad effetto prettamente centrale, anche gli oppioidi possiedono azione periferica, in quanto le tre classi recettoriali principali di tali farmaci sono state identificate anche a livello recettoriale. Se occupati dal ligando e sovraespressi durante un processo infiammatorio, i recettori inducono il rilascio di peptidi oppioidi endogeni. Lo sviluppo di analgesici oppioidi selettivi per i recettori periferici potrebbe rappresentare una frontiera fondamentale nel campo della terapia del dolore, eliminando gli effetti centrali che costituiscono il limite importante di tale categoria di farmaci.

Sensibilizzazione centrale

Così come in sede recettoriale, esistono meccanismi di sensibilizzazione anche a livello di corna dorsali. L'incremento di eccitabilità dei neuroni sensitivi secondari è inizialmente indotto dagli stimoli che provengono dai nocicettori periferici, mentre viene mantenuto, in un secondo momento, da modificazioni di trascrizione genica a livello cellulare. Le manifestazioni cliniche di tale fenomeno risultano evidenti già in pochi secondi di trasmissione di uno stimolo algico di una certa entità. Un aumento di percezione del dolore viene così riscontrato sia in corrispondenza del sito coinvolto dal processo infiammatorio (iperalgesia primaria) che a livello di

tessuti circostanti (iperalgisia secondaria). Le fibre A β , che in condizioni fisiologiche non veicolano informazioni nocicettive, vengono reclutate per contribuire alla trasmissione dello stimolo algico, pertanto vie sensitive tattili assumono la capacità di evocare dolore (allodinia tattile). I meccanismi cellulari di sensibilizzazione centrale sono molto simili a quelli descritti per la periferica. A livello di corna dorsali, Glutammato, sostanza P e BDNF attivano numerose vie di comunicazione intracellulare, aumentando l'efficacia sinaptica attraverso due processi fondamentali: l'alterazione dei canali ionici e recettori e la sovraespressione e mobilitazione recettoriale. Un recettore chiave coinvolto in questo meccanismo è l'NMDA, il quale, fosforilato ad opera del legame con il Glutammato, induce sia la rimozione del blocco ionico del Magnesio, aumentando la sensibilità al Glutammato dei recettori AMPA adiacenti, che la migrazione di altri NMDA da siti di stoccaggio intracellulare alla membrana. Recenti studi dimostrano l'importanza della risposta neuro-immunitaria nel mantenimento del processo di sensibilizzazione centrale in corso di dolore cronico indotto da lesioni a nervi. Le cellule della glia, un tempo considerate come vie passive di trasmissione e deputate al nutrimento e la "manutenzione" dei neuroni, nel decennio precedente hanno assunto un ruolo chiave nell'induzione e mantenimento di stati nocicettivi patologici. Tali cellule, attivate in seguito ad infiammazione o lesione nervosa, rilasciano numerose sostanze flogogene, quali interleukine(IL)-1 β e IL-6, Tumor Necrosis Factor (TNF) e fattori chemiotattici nei confronti di macrofagi e neutrofili. Tutte queste sostanze sono in grado di generare e mantenere lo stato di sensibilizzazione centrale al dolore e sembrerebbero interferire con l'efficacia degli analgesici oppioidi. E' infatti ormai chiaro come queste cellule riescano a regolare azione analgesica, tolleranza, dipendenza ed effetti d'astinenza legati alla morfina e molecole simili. Tra i farmaci in grado di contrastare lo stato di sensibilizzazione centrale, quelli in grado di inibire i recettori NMDA hanno indubbiamente un ruolo fondamentale. Le due molecole della categoria maggiormente studiate sono, ad oggi, la ketamina e l'amantadina. La ketamina è un NMDA antagonista efficace, in grado di contrastare la fase

precoce del processo di sensibilizzazione centrale, ma l'ampia diffusione dei recettori target in tutto il sistema nervoso centrale e l'incredibile variabilità farmacodinamica tra un individuo ed un altro ne limitano l'utilizzo clinico. L'amantadina invece è un vecchio farmaco antivirale capace di stabilizzare i canali NMDA impedendone l'apertura ed il conseguente flusso ionico, proprietà che conferisce alla molecola una maggior sicurezza di utilizzo clinico, scevra da effetti centrali indesiderati. Un'altra molecola sempre più utilizzata dai medici veterinari come adiuvante analgesico è il Gabapentin, un farmaco nato come anticonvulsivante, in grado di legare una specifica subunità dei canali del calcio voltaggio dipendenti a livello di presinaptico (sovraespressi in corso di sensibilizzazione centrale). E' interessante sottolineare come l'azione analgesica di tale farmaco sembri essere in rapporto di diretta proporzionalità con il grado di sensibilizzazione centrale in atto. Anche in questa fase, i FANS giocano un ruolo importante, in quanto le COX-2 vengono espresse a livello centrale diverse ore dopo un danno tissutale periferico. Le future molecole attive in questa fase critica dovranno avere proprietà NMDA antagonista senza effetti centrali, oppure essere in grado di inibire le cellule della glia, o direttamente citochine e fattori chemiotattici, in modo da ridurre la tolleranza agli oppioidi ed aumentarne l'efficacia analgesica negli stati di dolore cronico neuropatico.

DOLORE E STRESS

Un dolore prolungato o non trattato provoca uno stato di stress esteso e deleterio. Lo stress è un complesso di modifiche adattative di natura comportamentale, nervosa, endocrina, immunitaria, ematologica e metabolica, atte al ripristino dell'omeostasi. Natura, grado e durata dello stimolo sono fattori importanti per determinare l'entità delle risposte adattative evocate. Manovre come la manipolazione di un anca in un cane o il contenimento nel gatto, generalmente danno origine ad uno stress di breve durata, mentre in situazioni potenzialmente più pericolose si ha una risposta che prepara l'animale a situazioni di emergenza al fine di garantirne la sopravvivenza (fight or flight). Il dolore acuto, generato da un trauma chirurgico o accidentale, è in grado di evocare uno stress di grado importante, caratterizzato dall'attivazione del sistema nervoso autonomo simpatico, secrezione di glucocorticoidi da parte delle ghiandole surrenali (soprattutto cortisolo), incremento del rate metabolico, ritenzione di sodio ed acqua ed alterazione del metabolismo di glucidi e proteine. Quando lo stress è intenso o perdura per lungo tempo finisce con il perdere la propria funzione adattativa, stimolando intensamente i vari circuiti nervosi ed endocrini che presiedono l'omeostasi: tale condizione viene comunemente definita stato di "distress". Un dolore intenso evoca risposte comportamentali, autonome, neuroendocrine ed immunitarie responsabili di eventuali auto-mutilazioni, immunodeficienza ed il perdurare di uno stato patologico che può condurre a morte l'animale.

INDICATORI COMPORTAMENTALI DI STRESS E DOLORE

Il dolore è quindi un importante fattore stressante responsabile di cambiamenti a livello di sistema nervoso centrale (plasticità neuronale) che determinano una modifica del comportamento, livello di stato d'allerta, capacità d'apprendimento e memoria. Stimoli sensoriali intensi

(somatosensitivi, visivi, acustici...) attivano siti quali locus coeruleus, ipotalamo, amygdala, ippocampo e corteccia cerebrale, tutti coinvolti nella realizzazione di una risposta adattativa allo stress. Ad esempio, la sola presenza di un cane nelle vicinanze è in grado di raddoppiare o triplicare l'attività neuronale di un gatto, generando pertanto uno stato di stress ed evidenti modifiche comportamentali. Aumenti della concentrazione di CRF (corticotropin-releasing-factor) a livello di ipotalamo, amygdala e locus coeruleus, ad esempio, provocano un aumento dello stato di preoccupazione, ansia, paura ed, in alcuni soggetti, persino rabbia. Inoltre il CRF è in grado di stimolare il locus coeruleus alla produzione di ACTH (ormone adrenocorticotropo), norepinefrina, dopamina e 5-idrossitriptamina, inducendo ipereccitabilità ed agitazione. Il dolore nei piccoli animali domestici è frequentemente associato a cambiamenti comportamentali: una zoppia, ad esempio, è un buon indicatore di un danno acuto o cronico. Il riconoscimento e l'osservazioni di tali modifiche nel comportamento rappresenta il metodo meno invasivo e forse più valido nella determinazione dell'intensità di dolore e relativo stress associato.

COMPONENTI BIOLOGICHE DELLA RISPOSTA ALLO STRESS

Sistema nervoso autonomo

L'attivazione del sistema nervoso autonomo simpatico è uno dei principali effetti indotti dallo stress. L'attivazione ipotalamica conseguente ad uno stimolo algico determina un graduale aumento del tono simpatico, con conseguente aumento della frequenza cardiaca, pressione sanguigna, sudorazione, erezione dei peli e dilatazione pupillare. Inoltre, la secrezione di cortisolo e catecolamine a livello di ghiandole surrenali e la diffusione di noradrenalina dalle terminazioni nervose simpatiche post-gangliari non fanno altro che amplificare tali effetti centrali.

Asse neuroendocrino

L'asse neuroendocrino può essere definito come interfaccia tra sistema nervoso centrale e ghiandole ed organi coinvolti nel meccanismo della risposta allo stress. Stimoli uditivi, visivi e somatosensitivi vengono trasmessi all'ipotalamo o direttamente all'amygdala, attivando così l'asse ipotalamo-ipofisario-surrenale, con conseguente secrezione di CRF e peptide vasoattivo intestinale (VIP), in grado di indurre il rilascio ipofisario di ACTH, melanocortina, prolattina, vasopressina, TSH e GH. Le conseguenze metaboliche di tale cascata ormonale sono un aumento dei processi catabolici, la mobilitazione di sostanze atte a fornire energia a tessuti danneggiati e ritenzione di sodio ed acqua al fine di mantenere una volemia adeguata a sostegno del comparto cardio-vascolare. CRF, ACTH e corticosteroidi sono importanti modulatori dei processi di memorizzazione ed apprendimento. Il rilascio di CRF a livello encefalico è una delle più importanti componenti della risposta allo stress. Esso infatti agisce in sinergia con la vasopressina stimolando la secrezione di ACTH al fine di garantire un maggior grado di resistenza e sopravvivenza cellulare, rilascio di beta-endorfine a funzione analgesica e norepinefrina, agendo anche direttamente come neurotrasmettitore a livello centrale. Il cortisolo stimola la gluconeogenesi, determina un aumento di proteolisi e lipolisi, coadiuva gli effetti delle catecolamine ed ha un'importante azione antinfiammatoria. La concentrazione ematica di cortisolo può essere indice del grado di stress in atto nella maggior parte delle specie animali, ed i soggetti in cui non si verificano innalzamenti dei livelli sierici di tale ormone sono correlati ad un maggior tasso di mortalità. L'aumento di catecolamine circolanti è in grado di indurre glicolisi, gluconeogenesi, inibizione secrezione di insulina, aumento dell'insulino-resistenza a livello periferico, lipolisi, aumento di frequenza cardiaca e respiratoria, pressione sanguigna e gittata cardiaca, al fine di preparare l'animale alla lotta o alla fuga (fight or flight response). Endorfine endogene, Gh, adrenalina e glucocorticoidi sono in grado di stimolare la secrezione pancreatica sia di glucagone che di insulina (effetto β -

adrenergico). Solitamente una procedura chirurgica determina un aumento della secrezione di glucagone ed una riduzione della secrezione di insulina, determinando glicogenolisi epatica, gluconeogenesi a partire da aminoacidi e conseguenti iperglicemia e glicosuria. Il GH stimola la sintesi proteica e ne inibisce il catabolismo, promuove la lipolisi ed agisce come antagonista insulinico, risparmiando glucosio da destinare al sistema nervoso. Gli ormoni tiroidei stimolano il metabolismo dei carboidrati, la produzione di calore ed aumento e sensibilizzazione dei recettori beta-adrenergici a livello cardiaco, aumentandone pertanto la sensibilità alle catecolamine circolanti. La vasopressina, conosciuta anche come ormone antidiuretico, promuove la ritenzione idrica, ed il suo rilascio a livello di circolo sistemico, unito all'aumento di concentrazione ematica di renina (per effetto simpatico), determina un aumento della volemia, maggiore tono e risposte di adattamento vascolari, così da sostenere o incrementare l'attività cardiovascolare.

Metabolismo

La secrezione di glucagone e la carenza di insulina, caratteristiche della risposta allo stress in corso di dolore, possono portare ad uno stato di iperglicemia prolungata, associata ad un aumento di incidenza di infezione delle ferite, morbidità e mortalità. L'attività lipolitica, stimolata da cortisolo, catecolamine e Gh, determina un aumento del livello in circolo di acidi grassi e glicerolo, quest'ultimo importante ai fini della gluconeogenesi epatica. Aumentati livelli ematici di cortisolo provocano un'incremento nell'attività catabolica proteica, ovvero il rilascio di aminoacidi liberi nel torrente circolatorio, utili ai fini della sintesi di nuove proteine o di glucosio. Di fatto la supplementazione proteica (es. glutamina ed arginina) nell'immediato post-operatorio determina una minore incidenza di infezioni ed un minor tempo di ricovero necessario. Anche citochine e prostaglandine potrebbero indurre un aumento dell'attività catabolica proteica in maniera indiretta,

ovvero aumentando il metabolismo basale e, di conseguenza, il fabbisogno energetico dell'organismo.

Sistema immunitario

Il dolore, di qualunque natura esso sia, e pertanto lo stress associato sono in grado di modulare l'attività del sistema immunitario in maniera direttamente proporzionale all'intensità ed alla durata dello stimolo. Un dolore da blando a moderato, associato ad un danno tissutale esteso determina l'attivazione della risposta immunitaria attraverso citochine, interleuchine ed altri fattori, ma in caso di cronicizzazione è in grado di provocare un incremento di cortisolo, epinefrina, norepinefrina e glucagone circolanti, tutti capaci di determinare una soppressione sia della risposta immunitaria umorale che di quella cellulo-mediata, ed anche la presenza di oppioidi sia endogeni che esogeni potrebbe contribuire allo stato di immunodepressione. Citochine ed altre proteine a basso peso molecolare vengono prodotte da fibroblasti, leucociti e cellule endoteliali di un tessuto traumatizzato al fine di proteggere l'organismo mediante distruzione e rimozione di organismi e sostanze esogeni e nocivi tramite una risposta infiammatoria locale. Quando il trauma tissutale è importante, l'eccessiva sintesi e mobilitazione di citochine può condurre ad una sindrome di risposta infiammatoria sistemica (SIRS) ed il dolore evocato contribuisce a tale stato inducendo modificazioni endocrine ed autonome del tutto simili. Le principali molecole coinvolte negli stati di stress sono l'interleukina-1, l'interleukina-6 (IL-1, IL-6) ed il tumor necrosis factor (TNF). Le interleuchine inducono il rilascio delle cosiddette proteine di fase acuta, rialzo termico e sintesi di prostaglandine, oltre a stimolare il rilascio ipofisario di ACTH e quindi di cortisolo. Il TNF è invece responsabile dei segni clinici dello shock, quali ipotensione, emocoagulazione, iperglicemia, iperkaliemia, acidosi metabolica ed attivazione a cascata dei fattori del complemento. La risposta di fase acuta può essere evocata da stress di grado importante, indotto da qualsiasi causa

ed è caratterizzata essenzialmente dal rilascio epatico di mediatori chimici proteici implicati nella neutralizzazione di sostanze tossiche e nella riparazione tissutale. Tali fattori, se prodotti in eccesso, contribuiscono alla SIRS. Tra le proteine più importanti vale la pena citare la C-reattiva (ottimo indicatore di stress, infezione, e morbidità in generale), il fibrinogeno, macroglobuline ed anti-proteasi.

Cambiamenti morfologici

Dolore e/o stress cronici sono in grado di indurre modifiche morfologiche a lungo termine tipiche, tra cui crescita stentata, perdita di pelo o mantello in condizioni scadenti, perdita di peso e parvenza di invecchiamento precoce.

BUPRENORFINA

CARATTERISTICHE E MECCANISMO D'AZIONE

La Buprenorfina è un potente oppioide semisintetico, altamente lipofilo, derivato dalla tebaina, membro della classe delle 6,14-endo-etanotetraidro-oripavine. Tradizionalmente descritta come agonista parziale dei recettori μ ed antagonista dei recettori κ , tale molecola risulta in realtà, da studi recenti, agonista puro per i recettori μ nel Ratto, con effetti quali analgesia soprasspinale, depressione respiratoria (comunque di grado nettamente inferiore rispetto ad altri agonisti puri, specie in soggetti sani) e miosi. L'affinità della buprenorfina nei confronti dei μ recettori è tale da poter teoricamente spiazzare altri agonisti puri somministrati contemporaneamente, ragion per cui potrebbe essere utilizzata anche per farne regredire i vari effetti indesiderati e non (analgesia). Tra gli effetti legati all'antagonismo verso i recettori κ vengono riconosciuti disforia, effetti psicomimetici ed, anche in questo caso, un certo grado di analgesia soprasspinale. Seppur con affinità nettamente inferiore rispetto alle due classe precedenti, va ricordato che la buprenorfina è in grado di legarsi anche ai recettori per gli oppioidi di tipo δ , con effetti correlati tuttora sconosciuti. Oltre alle tre classi recettoriali per gli oppioidi ormai assodate, è degna di nota la scoperta di una nuova classe di recettori, cosiddetta OR 1, che vede come ligando naturale la nocicettina (altresì identificata come orfanina), in grado di diminuire considerevolmente i livelli di dopamina circolante agendo sia come antagonista endogeno diretto, che inibendo il GABA (Acido Gamma-aminobutirrico), ottenendo effetti sia analoghi che opposti a quelli degli oppioidi a seconda della localizzazione di tali recettori. Nei confronti di questi ultimi targets, la buprenorfina è stata descritta come agonista parziale, mentre il suo metabolita principale (norbuprenorfina) come agonista puro. Diversi studi hanno dimostrato la validità di buprenorfina come analgesico post-operatorio nel Cane, paragonandone addirittura l'efficacia a quella della

morfina nell'utilizzo post-artrotomia. La dose letale media della buprenorfina cloridrato somministrata per via endovenosa nel Cane è di 79 mg/kg e l'indice terapeutico (dose letale media / dose efficace media) nel Ratto è 12,313. Nel Cane la sua dose clinica varia tra 0.01-0.02 mg/kg e, somministrata sia per via endovenosa che intramuscolare, ha effetto analgesico per una durata di circa 6-8 ore. E' interessante notare come in diverse specie sia gli effetti clinici che quelli indesiderati, anche all'aumentare progressivo della dose (entro un range piuttosto ampio), non superano mai una certa entità (ceiling effect), rendendola una molecola piuttosto sicura. Proprio questa sua lunga durata d'azione, associata ad una cinetica insolita, bassa incidenza di vomito ed effetti cardio-vascolari trascurabili rispetto ai farmaci della stessa classe, la rende un interessante oggetto di studio nonché utilizzo clinico, tanto da farle guadagnare il titolo di analgesico tra i più utilizzati in Medicina Veterinaria sia in Italia che in Regno Unito, Sud Africa, Stati Uniti (in particolar modo nel Gatto) ed Australia.

La buprenorfina ed i suoi tre metaboliti principali hanno tutti profili farmacologici distinti. Nell'Uomo, la buprenorfina viene ampiamente metabolizzata, tanto che solo una minima quota di molecola "tal quale" subisce processi di escrezione renale. La via metabolica principale consiste nella N-dealchilazione, processo catalizzato per un 80-90% dal citocromo P450, attraverso il quale si genera il metabolita norbuprenorfina. Infine, sia la buprenorfina che la norbuprenorfina subiscono un processo di glucuronazione epatica, da cui originano buprenorfina-3-glucuronato (B3G) e norbuprenorfina-3-glucuronato (N3G). Inizialmente, la formazione di norbuprenorfina è stata considerata una via di inattivazione, in quanto il suo potere analgesico (nel Ratto) risultava essere cinquanta volte inferiore rispetto alla molecola pura considerata la dose endovenosa, ed un quarto inferiore per quanto riguarda quella intracerebroventricolare. Dati attuali invece dimostrano l'esatto contrario: la norbuprenorfina risulta attiva nei confronti di tutte le classi recettoriali per gli oppioidi ad eccezione degli OR

1, con effetti quali depressione respiratoria, inibizione della locomozione ed un effetto analgesico circa quattro volte inferiore a quello della buprenorfina stessa. L'onset ed il picco d'azione dopo somministrazione endovenosa avvengono rispettivamente a 45 e 60 minuti, mascherando quelli della molecola d'origine, mentre gli effetti depressanti insorgono ad appena 15 minuti dalla somministrazione. Nel Ratto, questa depressione respiratoria dose-dipendente è addirittura dieci volte più intensa rispetto a quella causata dalla molecola madre, ed è interessante, a tal proposito, l'ipotizzata azione antagonista della molecola d'origine nei confronti di tale effetto tramite legame con i recettori OR 1. Nonostante il processo di glucuronazione sia generalmente considerato come una via di inattivazione e detossificazione, vi sono diversi esempi di come talvolta lo stesso procedimento possa avere effetto contrario, uno tra tutti è il caso di morfina-6-glucuronato, con affinità simile per gli stessi recettori target della molecola d'origine ma azione trecento volte maggiore se inoculata per via intracerebroventricolare. Sino allo scorso anno non si aveva alcun dato farmacologico riguardo i metaboliti glucuronati della buprenorfina, poi uno studio sul Ratto ha dimostrato come questi siano biologicamente attivi, rappresentando i primi casi documentati di composti-3-glucuronati ad avere tale caratteristica. Nello specifico, la B3G, legandosi (con minore affinità rispetto a quella della buprenorfina) ai recettori μ , δ e OR 1, ha rivelato un'azione analgesica quattro volte inferiore rispetto a quella della buprenorfina, con picco plasmatico a 60 minuti, mentre N3G ha proprietà di agonista per i recettori OR 1 ed ancora non ben definita verso i κ , con conseguente blanda attività analgesica (notevolmente inferiore rispetto a quella degli altri metaboliti) e riduzione importante sia del volume tidale che dell'attività locomotoria. Nel Cane, alla somministrazione di buprenorfina-3-glucuronato direttamente a livello duodenale non segue un ricircolo entero-epatico, ma l'assenza di buprenorfina libera a livello plasmatico dimostra che qualsiasi ricircolo dei metaboliti primari non andrebbe a modificare l'emivita della molecola. Il profilo metabolico a seguito della somministrazione parenterale di buprenorfina nell'Uomo e nel Cane è del tutto simile, ad indicazione di come, in entrambe le specie,

l'impatto delle cross reazioni con i metaboliti sembri avere effetti minimi sulla cinetica dopo un bolo singolo, come dimostrato anche da uno studio in cui sono stati utilizzati anticorpi radiomarcati. Nel Gatto i prodotti metabolici della buprenorfina sono sconosciuti e bisogna comunque tener conto della minor capacità di glucuronidazione epatica propria della specie. Nell'Uomo i livelli sierici del farmaco non variano con un rapporto di proporzionalità diretta alla dose somministrata, così come qualsiasi valore clinicamente o soggettivamente misurato, a suggerimento di come il suo andamento non possa essere predetta a partire da un certo dosaggio, ma occorrono studi clinici in grado di descrivere tale correlazione.

CINETICA

La farmacocinetica di buprenorfina è stata valutata da studi in varie specie, da cui risulta un ampio grado di similitudine tra i livelli plasmatici di morfina, buprenorfina e petidina sia nel cane che nel gatto dopo somministrazione endovenosa. Tuttavia, fatta eccezione per i lavori più recenti, gli studi di cinetica precedenti presentano tra loro differenze importanti per quanto concerne parametri come la dose, enormemente superiore rispetto a quella clinica (in alcuni variabile tra 0.7 e 2.5 mg/kg), i tempi d'osservazione, le variabili cinetiche, le metodiche analitiche e l'utilizzo di un unico accesso venoso per effettuare sia la somministrazione del farmaco che i prelievi ematici seriali, con il rischio di sovrastimare le concentrazioni plasmatiche di farmaco e sottostimarne il volume di distribuzione. Inoltre, tra le variabili più importanti relative alle diverse pubblicazioni bisogna indubbiamente considerare la metodica analitica utilizzata: in alcuni studi condotti sul gatto, ad esempio, i limiti di quantificazione insufficienti, ovvero l'impossibilità ad individuare e dosare separatamente la molecola tal quale ed i metaboliti, rappresentano notevoli gap di conoscenza. Come evidenziato da ricerche condotte su gatto, coniglio, ratto, Uomo e cane, e come intuibile dalle caratteristiche fisico-chimiche

della molecola, dopo somministrazione endovenosa, la concentrazione plasmatica della buprenorfina decrece con un profilo cinetico a tre steps, con due fasi di distribuzione ed una di eliminazione. Durante la fase iniziale, la concentrazione del farmaco subisce un rapido decremento, corrispondente ad un basso valore di $t_{1/2\alpha}$ (circa 2.9 min.), simile in Uomo, Cane e Coniglio e non specificato nel Gatto, nel quale comunque si nota un declino ad andamento curvilineo con fase veloce durante la prima ora, analogamente alle altre specie. In tutte le specie prese in analisi, dopo questo calo rapido (da un'ora dopo la somministrazione), la concentrazione plasmatica rimane a bassi livelli, con un $t_{1/2\beta}$ elevato, traduzione numerica di una lenta eliminazione dai tessuti periferici. All'interno di un modello a più compartimenti è importante notare come questa molecola si distribuisca lentamente e con un certo ritardo nel compartimento dei tessuti periferici. In uno degli studi più recenti sul cane, infatti, mentre i compartimenti centrali V1 e V2 risultano simili all'acqua totale dell'organismo, V3, ovvero il compartimento periferico, è risultato essere sette volte maggiore rispetto al volume centrale. In seguito alla distribuzione al primo ed al secondo compartimento predomina la fase di eliminazione ed i livelli di farmaco presente a livello centrale calano lentamente, tant'è vero che, negli studi ad impiego di una dose clinica, la clearance tra il primo ed il secondo compartimento (CLD2, valore medio: 1659.3 mL/min), risulta quattro volte più rapida rispetto a quella tra quello centrale e periferico (CLD3, valore medio: 391.3 mL/min). E' bene, a tal proposito, tenere in considerazione il concetto secondo cui se CL e CLD3 hanno valore simile, ciò significa che la clearance dai tessuti periferici rappresenta la vera e propria fase di eliminazione della molecola. I valori di C_{max} misurati da precedenti lavori anche piuttosto recenti sono tutti piuttosto simili tra loro, anche se, in alcuni casi, l'aver effettuato il primo prelievo ematico a minimo 2 min. di distanza dal bolo potrebbe rappresentare un limite in quanto i reali picchi di C_{max} e T_{max} rischiano di non essere stati identificati per tempo. L'AUC (area sotto la curva) risulta differente in lavori svolti sul Cane rispetto al Gatto. Tale discrepanza sarebbe legata, secondo gli Autori, ad una serie di fattori tra i

quali il diverso tasso di glucuronazione, differente densità ed/o affinità recettoriale ed una clearance inferiore nel cane, in quanto i valori di $t_{1/2\beta}$ misurati risultano sostanzialmente simili tra le due specie. Se consideriamo i farmaci soggetti ad una cinetica di prim'ordine, la quantità di molecola sottoposta a processi di clearance per unità di tempo dovrebbe essere indipendente dalla dose somministrata, eppure da uno studio recente sul ratto è risultata una cinetica di buprenorfina non lineare. La frazione libera plasmatica del farmaco è determinata dalla concentrazione libera dello stesso, di conseguenza, per sostanze a cinetica non lineare la frazione libera non rimane costante al variare della concentrazione. La E_{body} , ovvero la percentuale di farmaco sottoposta a clearance durante un singolo passaggio attraverso gli organi di escrezione, è strettamente correlata alle sue caratteristiche. Dai dati estrapolati da uno studio del 2008 sul cane risulta un tasso di escrezione di buprenorfina basso. Considerando che per i farmaci con tale caratteristica la body clearance totale è direttamente proporzionale alla sua frazione libera nel plasma. Anche per quanto riguarda il Vd_{ss} , si nota una certa differenza tra i lavori più vecchi ed i più recenti, nei quali risulta inferiore. Un alto Vd_{ss} indica una scarsa ritenzione plasmatica di farmaco, così come avviene per molecole che si distribuiscono nel tessuto adiposo, che si legano a proteine plasmatiche e/o tessuti periferici o vengono da essi sequestrate. Le varie differenze potrebbero trovare spiegazione sia nell'utilizzo di due vie d'accesso venoso anziché una sola, piuttosto che nel dosaggio impiegato, in relazione al fenomeno del legame con le proteine plasmatiche dosaggio-dipendente: l'effettiva quota legata alle proteine plasmatiche di farmaci ad alta percentuale di legame come la buprenorfina (96%), oltre un certo dosaggio dovrebbe saturarsi, per cui all'aumentare della dose aumenta la frazione di farmaco che si sposta dal plasma al comparto tissutale. In molte specie, tra cui Uomo, pecora e gatto, il picco dell'azione analgesica della buprenorfina non si manifesta prima di 45 - 50 minuti (90 nel gatto) dalla somministrazione endovenosa e perdura, nel cane, da 4 a 6 o più ore, a seconda dei lavori presi in esame. A tal proposito, i dati di cinetica non sono i principali fattori di determinazione della dose clinica di

buprenorfina del Cane, che si basa piuttosto sull'efficacia clinica (analgesica). In uno studio che prevedeva la stimolazione algica sulla polpa dentaria nel cane è stato registrato un aumento della soglia di risposta al dolore del 30% in seguito alla somministrazione sottocutanea o sublinguale di una dose di buprenorfina compresa tra 0.02 e 0.04 mg/kg, con una durata d'effetto mai inferiore alle 3 ore. Tuttavia lo studio è terminato prima del cessare dell'effetto analgesico del farmaco. In un lavoro sul gatto è stata calcolata la concentrazione plasmatica di buprenorfina a cui corrisponde un aumento della soglia di risposta a stimolazione termica del 10%; se il livello plasmatico terapeutico fosse lo stesso per il Cane (come accade in entrambe le specie, ad esempio, per il fentanyl), basandosi sui più recenti dati di cinetica, la somministrazione endovenosa di buprenorfina dovrebbe garantire un effetto analgesico sino ad un massimo di 4 ore. L'estensione di durata dell'azione terapeutica oltre questo tempo calcolato potrebbe essere legata alla lenta dissociazione tra ligando e recettore o equilibrio di biofase. Recentemente è stato condotto uno studio da cui risulta un ampio range di valori per il $t_{1/2\beta}$, giustificato dagli Autori come correlato all'entità della redistribuzione o al polimorfismo del citocromo P450, responsabile del metabolismo e della clearance della buprenorfina. Dato che k_{el} , ovvero il valore determinante il $t_{1/2\beta}$, viene derivato dalla componente terminale della curva tempo-concentrazione dopo il raggiungimento dello pseudo-equilibrio, tale variabilità nel valore dell'emivita potrebbe essere dovuto a differenze di clearance del farmaco. Un'ulteriore spiegazione di questo dato potrebbe risiedere nella variabilità d'espressione del sistema enzimatico del citocromo P450 (implicato nel metabolismo della molecola), ampiamente dimostrata nell'Uomo. Tale dato spiegherebbe come mai un dosaggio standard di un farmaco possa determinare un effetto terapeutico prolungato, un mancato effetto o addirittura una forma di intossicazione e, se valido anche nel cane, il suddetto concetto fornirebbe una valida spiegazione alla differenza del valore $t_{1/2\beta}$ tra i diversi soggetti. La differenza tra soggetti del $t_{1/2\beta}$ calcolato, inoltre, suffraga ulteriormente la tesi secondo cui il dosaggio e gli intervalli di somministrazione di una simile molecola debbano essere decisi a fronte di

una risposta clinica anzichè seguendo indicazioni standard. Nel 2005, Yassen et al. scoprirono che insorgenza e scomparsa lente dell'effetto analgesico della buprenorfina non sarebbero dovuti ad un lento processo di legame e dissociazione dai recettori target, bensì dal lento raggiungimento di un equilibrio di biofase, ovvero l'elemento che determina le caratteristiche di distribuzione dell'oppioide al sito effettore ed influenza l'intensità dell'effetto biologico e la durata dell'azione analgesica. In virtù dell'alta lipofilia, si pensa che la buprenorfina sia in grado di attraversare rapidamente la barriera emato-encefalica e che il ritardo di insorgenza dell'effetto sia dovuto al tempo di distribuzione nello stesso parenchima cerebrale. Nel ratto, il calo dei livelli cerebrali di buprenorfina è di gran lunga più lento rispetto a quello plasmatico (rispettivamente 2.3 contro 1.4 ore di $t_{1/2\beta}$ rispettivamente), così come il rapporto tra concentrazione cerebrale e plasmatica dopo un singolo bolo endovenoso è di 3 a 15 minuti e 10.5 dopo 6 ore, come confermato nel babuino. Questi dati suggeriscono come l'eliminazione del farmaco dall'encefalo costituisca il punto chiave nella scomparsa dell'effetto analgesico della molecola in base alla dose di somministrazione. Anche nel gatto si rileva un certo ritardo tra il picco di concentrazione ematica della molecola e l'effetto dinamico, tanto che la soglia di risposta allo stimolo termico aumenta in un intervallo di tempo compreso tra i 30 ed i 360 minuti dopo la somministrazione transmucosale di 0.02 mg/kg, con effetto massimo a 90 minuti, mentre il T_{max} viene registrato tra 1 e 2 minuti post-somministrazione.

PARTE SPERIMENTALE

OBBIETTIVO DELLO STUDIO

Lo studio clinico in questione ha due obiettivi principali. Il primo è la validazione di una metodica analitica cromatografica ad alte prestazioni in grado di identificare livelli plasmatici di BUP e NOR con limiti di detezone inferiori rispetto ai precedenti studi. Inoltre, mentre Medicina Umana esistono diverse pubblicazioni ed indicazioni riguardo l'infusione continua di tale farmaco, in Veterinaria siamo riusciti a trovare solo indicazioni aneddotiche sul range di velocità d'infusione in seguito ad un bolo da 15 µg/kg sia nel cane che nel gatto (Hansen B., Analgesia for the critically ill dog or cat: an update, pag. 1358, Vet. Clin. of north America: small animal practice). Pertanto, un ulteriore scopo del nostro lavoro è l'ottenimento di dati cinetici a suffragio dell'utilizzo di BUP in infusione continua ad un determinato rate, stabilito da noi a priori in base ai dati di farmacocinetica ricavati dai più recenti studi sul singolo bolo. Alla luce dell'ormai assodata efficacia clinica di BUP nel controllo del dolore acuto da lieve a moderato, considerati i suoi esigui effetti indesiderati ed i vantaggi sia farmacocinetici che dinamici di un'infusione continua rispetto a dei boli successivi, riteniamo che, qualora supportata da dati cinetici e clinici, l'utilizzo di BUP in infusione continua possa rappresentare una valida strategia analgesica sia nel post-operatorio che in pazienti critici degenti.

MATERIALI E METODI

ANIMALI

Questa ricerca è stata autorizzata dal Comitato Etico-Scientifico dell'Università di Bologna e comunicato al Ministero della Salute il 01/12/2010 (Prot. 55948-X/10). Per questo studio vengono utilizzate dieci cagne di proprietà, di peso superiore ai 15 kg, giovani e puberi (massimo 5 anni per i soggetti di taglia media e 3 per quelli di taglia grande), in anestro, presentate presso la nostra struttura per essere sottoposte ad intervento di ovariectomia elettiva. Le condizioni di salute dei soggetti vengono appurate tramite sola visita clinica e l'anestro, qualora dubbio, da un'esame colpocitologico effettuato ed interpretato da uno specialista in riproduzione animale.

PROTOCOLLO ANESTESIOLOGICO E MONITORAGGIO

Dopo l'inserimento di un catetere venoso periferico in una delle due vene cefaliche, i soggetti vengono premedicati con 20µg/Kg di Acepromazina maleato (Prequillan®, Ati) e 4 mg/Kg di Carprofen (Rimadyl®, Pfizer). Prima dell'induzione viene avviata una fluido terapia a 10 ml/kg/h di NaCl 0.9%. L'induzione dell'anestesia viene ottenuta mediante l'utilizzo di Propofol (Propovet®, Esteve) somministrato in boli ad effetto, i soggetti vengono intubati ed il mantenimento avviene tramite Isoflurano somministrato, assieme ad ossigeno al 100% tramite un circuito di Bain, lasciando l'animale in ventilazione spontanea. Prima dell'inizio della procedura viene applicato un catetere venoso centrale (Logicath, Smiths Medicals, met. Seldinger) da utilizzare successivamente per i campionamenti, oltre ad eseguire un blocco sottocutaneo lineare con Lidocaina cloridrato (Fort Dodge) diluita all'1% in corrispondenza della

porzione di cute da incidere e, prima della legatura di ogni legamento ovarico, viene effettuato uno “splash” con la medesima molecola alla stessa concentrazione, non superando mai una dose totale (considerati entrambi i blocchi) di 7 mg/kg. Durante la chirurgia vengono monitorati parametri vitali quali HR, RR, Capnogramma, ECG, spO₂ e NIBP (Dash 3000, GE). Ad una variazione di HR, RR o NIBP superiore del 20% rispetto al valore basale (soggetto in anestesia generale stabile da almeno 15' prima dell'applicazione delle pinze ferma-teli), viene adottato l'utilizzo di un bolo da 2µg/kg e successiva infusione continua di fentanyl citrato (Fentanest®, Pfizer) come rescue analgesia, escludendo il soggetto dallo studio. A termine chirurgia viene sospesa la fluidoterapia, l'animale viene estubato alla ricomparsa del riflesso della deglutizione e viene somministrato attraverso il catetere venoso periferico un bolo da 15µg/kg di BUP (Temgesic®, Schering-Plough), seguito da un flushing del caterere ed un'infusione endovenosa continua di 2.5µg/kg/h. con avvio 3' dopo il bolo tramite pompa a siringa (Alaris CC MKIII, Cardinal Healt). La valutazione del grado di sedazione ed analgesia durante il ricovero post-operatorio viene effettuata sempre dallo stesso operatore (anestesista) tramite uno score di sedazione e visual analogue scale rispettivamente. Il grado di sedazione è stato espresso mediante valore numerico secondo tale scala da noi ideata: 0 – Sensorio vigile, animale in grado di deambulare senza atassia. 1 – Sensorio vigile, animale atassico ma in grado di deambulare. 2 – Sensorio vigile, animale in decubito sternale, gravemente atassico al punto da non riuscire a deambulare. 3 – Sensorio depresso, animale in decubito laterale in grado di sollevare la testa indipendentemente da stimoli esterni. 4 – Sensorio depresso, animale in decubito laterale in grado di alzare la testa solo in seguito a stimolo esterno. 5 – Animale stuporoso. In caso di punteggio V.A.S. superiore a 5 l'animale viene escluso dallo studio e si opta per una l'utilizzo di lidocaina ed α_2 agonisti in infusione continua per almeno le sei ore successive alla sospensione di BUP, per poi passare all'impiego di agonisti puri.

PRELIEVI EMATICI

I prelievi ematici di un'aliquota di sangue intero pari a 1.5 ml vengono effettuati attraverso un sistema chiuso mediante connettore luer lock a pressione (Cardinal Health) con la seguente tempistica: uno prima di aver effettuato il bolo ed i successivi ad 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 45, 60, 120, 240 e 360 minuti dal bolo iniziale, viene interrotta l'infusione a 360' dal bolo ed seguiti altri prelievi ematici ad 1, 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480 e 720 minuti dalla sospensione del farmaco. I campioni vengono raccolti in provette a vuoto contenenti K₃EDTA e centrifugati (3000 rcf per 10') al fine di separarne il plasma.

METODICA ANALITICA

Campioni di plasma

La messa a punto e validazione della metodica è stata effettuata su campioni di plasma di cane. I campioni sono stati conservati in freezer a temperatura di -20°C +-5°C

Prodotti chimici

Per la fortificazione dei campioni sono stati utilizzati i seguenti standards:

- buprenorfina (purezza>99,7%) Cerilliant corporation, Round Rock, Texas
- buprenorfina deuterata (purezza>99,7%) Cerilliant corporation, Round Rock, Texas
- norbuprenorfina (purezza>99,9%) Cerilliant corporation, Round Rock, Texas
- norbuprenorfina deuterata (purezza>99,5%) Cerilliant corporation, Round Rock, Texas

I solventi utilizzati per l'analisi in massa erano tutti di grado LC/MS:

- acetonitrile, (Fluka);
- acido formico, (Fluka);
- acqua, (prodotta con sistema di filtrazione Human Power ® I);

Durante la preparazione del campione sono stati impiegati solventi di grado analitico:

- acetonitrile;
- clorobutano;
- acqua;

Strumentazione

Sistema UPLC-MS/MS

Come sistema cromatografico è stato utilizzato uno strumento UPLC ACQUITY, composto da una pompa binaria, degasatore, autocampionatore e termostato per la colonna (Waters Corporation, Milford, USA), accoppiato ad uno spettrometro di massa triplo quadrupolo Quattro Premier XE, dotato di una sorgente di ionizzazione ESCI™ Multi-Mode (Waters Corporation, Milford, USA). L'azoto di elevata purezza è stato prodotto da un generatore d'azoto N2Mistral-4 (DBS Instrument, Padova, Italy).

Condizioni cromatografiche

L'analisi è stata condotta in condizioni programmate con i seguenti parametri:

- ✓ Colonna Acquity HSS T3 1.8 µm , 50 x 2.1 mm (Waters), con precolonna uguale, termostate a 35°C.
- ✓ Fase mobile A ⇒ Acqua con 0,1% acido formico.
- ✓ Fase mobile B ⇒ Acetonitrile con 0,1% di acido formico.

- ✓ Gli analiti sono stati separati con il seguente programma cromatografico:
 - T0 min : 80% Fase A, 20% Fase B,
 - T4 min : 50% Fase A, 50% Fase B,
 - T5 min : 20% Fase A, 80% Fase B,
 - T5,5 min : 20% Fase A, 80% Fase B,
 - T6 min : 80% Fase A, 20% Fase B,
 - T8 min : 80% Fase A, 20% Fase B,

- ✓ Flusso: 0,3 mL/minuto.
- ✓ Volume d'iniezione: 10 µL (partial loop with needle overfill).

Condizioni MS/MS

Il detector ha operato in modalità ionizzazione elettrospray positivo (ESI+) ed in modalità di acquisizione MRM (multiple reaction monitoring). Sono state messe a punto le condizioni spettrometriche ottimali infondendo direttamente nello spettrometro di massa triplo quadrupolo una soluzione standard 10 ng/µL per ciascun analita. Per tali composti sono state trovate le 2 transizioni più importanti e le condizioni migliori per ottenerle (Tab. 1).

Composto	Transizione (m/z)	Cone Voltage (kV)	Collision Energy (eV)
BUPRENORFINA	468,09 > 55,10	59	44
BUPRENORFINA-D4	472,23 > 59,10	59	40
NORBUPRENORFINA	414,30 > 83,00	59	38
NORBUPRENORFINA-D3	417,00 > 83,00	59	38

Tabella 1. Valori spettrometrici principali

- ✓ Ionizzazione: ESI +
- ✓ Modalità di analisi: MRM
- ✓ Capillary: + 4,5 KV
- ✓ Cone Voltage: 75 V
- ✓ Extractor: 6 V
- ✓ RF lens: 3 V
- ✓ Source temperature: 140 °C
- ✓ Desolvation temperature: 500 °C
- ✓ Cone gas: 100 L/hr
- ✓ Desolvation gas: 800 L/hr

Altre strumentazioni

- evaporatore rotante UNIVAPO

Soluzioni di rinforzo e standards inteni

A partire da 1 ml di soluzione standard di BUP a 100 ppm si prepara una soluzione ad 1 ppm diluendo 1:100 nel modo seguente: si prelevano 50µl di BUP a 100 ppm e si porta ad un volume finale di 5 mL (soluzione HeOH:H₂O 1:1) in un matraccio tarato ad 1 ppm. Lo stesso identico procedimento viene utilizzato a partire dalla soluzione standard di NorBUP. Le soluzioni Mix di BUP e NOR da utilizzare per rinforzare i campioni di plasma “bianco” per la curva di taratura (da dispensare 100 µl per ciascuna), tenendo conto di un volume finale di 125 µl, sono state così preparate:

- ✓ 100ppb: 300µl di BUP a 1000ppb + 300µl di NorBUP a 1000ppb + 1800µl dil.
- ✓ 75ppb: 150µl di BUP a 1000ppb + 150µl di NorBUP a 1000ppb + 1300µl dil.
- ✓ 50ppb: 1000µl Mix 125ppb + 1000µl sol. dil.
- ✓ 25ppb: 600µl Mix 62.5ppb + 600µl sol. dil.

- ✓ 10ppb: 200µl Mix 125ppb + 1800µl sol. dil.
- ✓ 5ppb: 600µl Mix 12.5ppb + 600µl sol. dil.
- ✓ 1ppb: 200µl Mix 12.5ppb + 1800µl sol. dil.
- ✓ 0.5ppb: 600µl Mix 1.25ppb + 600µl sol. dil.

Per la preparazione degli standards interni, a partire da soluzioni a 100ppm sia di BUP-D4 che di NorBUP-D4 (marcate con Deuterio), dopo la stessa diluizione iniziale utilizzata per le soluzioni di rinforzo, si ottiene un Mix di standards interni a 250ppb nel seguente modo:

- ✓ 250ppb: 500µl BUP-D4 1000ppb + 300µl NorBUP 1000ppb + 1000µl dil.

Estrazione degli analiti dal plasma

Gli analiti vengono estratti dalla matrice biologica tramite procedimento in fase liquido/liquido secondo il seguente protocollo:

- Vengono trasferiti 500µl di plasma in provette di tipo Falcon da 15ml.
- Si diluisce il plasma con 500µl di soluzione tampone NaHCO₃ a pH 10.
- Si agita in vortex per 30 secondi.
- Vengono aggiunti 4ml di soluzione 1-clorobutano : ACN (4:1)
- Viene posta la soluzione in agitatore per 30 minuti.
- Si centrifuga a 5000 x g in centrifuga refrigerata a 4°C per 6 minuti.
- Viene trasferita la fase organica in provette di vetro.
- Si essicca la fase con UNIVAPO e si risolubilizza in 125µl di fase mobile (4:1).

Fase Mobile utilizzata: Sol. H₂O : ACN (80:20) + 0.1% H₃PO₄

Validazione

Il metodo messo a punto è stato validato utilizzando campioni di plasma opportunamente fortificati. In particolare sono stati valutati diversi parametri di seguito descritti.

Linearità

Per ciascuna delle tre giornate di validazione sono state preparate delle rette di taratura in matrice su cinque punti di concentrazione nel range da 0,125 a 25 ng/mL.

Accuratezza

L'accuratezza (precisione ed esattezza) è stata valutata analizzando campioni di plasma bianco_fortificati a tre livelli: 1,25; 6,25; 18,75 ng/mL. Questi campioni sono stati preparati freschi ognuna delle tre giornate di validazione ed iniettati almeno due volte. L'esattezza, valutata come distorsione (%), è stata calcolata correlando il valore rilevato con quello nominale; la precisione è stata espressa come coefficiente di variazione (CV%).

Limite di quantificazione

Il LOQ in questo studio è stato calcolato su matrici fortificate, pertanto il valore ottenuto considera anche la procedura di estrazione.

RISULTATI

Come emerge dai dati ottenuti, la validazione della metodica analitica è andata a buon fine e sono stati riportati eccellenti risultati in termini di Linearità (r^2 sempre maggiore di 0,999) ed Accuratezza (Tabelle 2 e 3). Il limite di quantificazione (LOQ), definito come il punto più basso della retta di taratura, è 0,125 ng/mL; questa concentrazione (inferiore rispetto agli studi precedentemente pubblicati) mostra sempre un rapporto segnale/rumore superiore a 10 (Fig.1). Pertanto il protocollo ha mostrato risultati conformi a quanto stabilito dai criteri di accettazione riportati nel corrispondente “Piano per la Qualità” e si è rivelato adeguato agli scopi sperimentali. Per ragioni di tempo non è stato possibile inserire in questa trattazione dati relativi alla cinetica di BUP nei cani utilizzati per lo studio.

		Giorno1	Giorno2	Giorno3	Interday (n=6)
1,25 ng/mL	Media (n=2)	1,3	1,2	1,3	1,3
	Precisione (CV %)	2,8	1,0	2,0	2,0
	Esattezza (Bias%)	0,0	-1,0	2,0	0,3
6,25 ng/mL	Media (n=2)	6,3	6,1	6,0	6,1
	Precisione (CV %)	0,6	0,2	2,7	2,5
	Esattezza (Bias%)	0,2	-1,8	-4,6	-2,1
18,75 ng/mL	Media (n=2)	19,3	18,4	18,7	18,8
	Precisione (CV %)	0,3	2,1	0,1	2,3
	Esattezza (Bias%)	3,0	-1,7	-0,3	0,4

Tab. 2: Dati di accuratezza relativi alla buprenorfina

		Giorno1	Giorno2	Giorno3	Interday (n=6)
1,25 ng/mL	Media (n=2)	1,2	1,2	1,2	1,2
	Precisione (CV %)	2,8	1,0	2,0	2,0
	Esattezza (Bias%)	0,0	-1,0	2,0	0,3
6,25 ng/mL	Media (n=2)	6,3	6,4	6,3	6,3
	Precisione (CV %)	0,6	0,2	2,7	2,5
	Esattezza (Bias%)	0,2	-1,8	-4,6	-2,1
18,75 ng/mL	Media (n=2)	19,2	19,4	19,1	19,2
	Precisione (CV %)	0,3	2,1	0,1	2,3
	Esattezza (Bias%)	3,0	-1,7	-0,3	0,4

Tab. 3: Dati di accuratezza relativi alla norbuprenorfina

GRAFICI

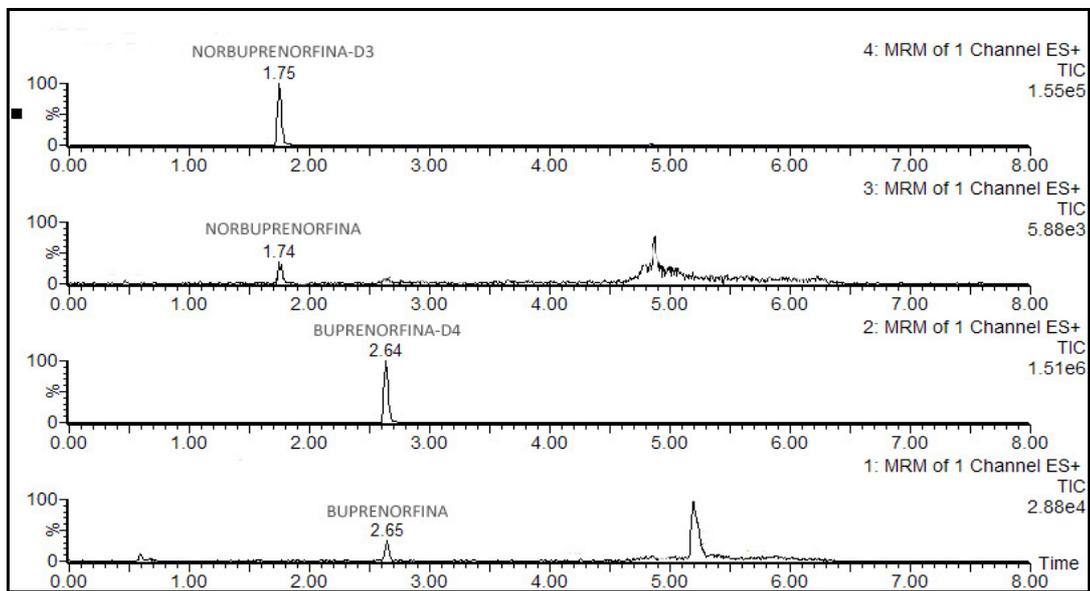


Fig. 1: Profilo cromatografico di un campione di plasma bianco fortificato alla concentrazione di 0,125 ng/mL

BIBLIOGRAFIA

- Abbo L.A., Ko J.C.H., Maxwell L.K., et al.: Pharmacokinetics of Buprenorphine following intravenous and oral transmucosal administration in dogs. *Vet. Ter.* 2008; **9** (2): 83–93.
- Alloui A., Zimmermann K., Mamet J., et al: TREK-1, a K1 channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J* 2006; **25**: 2368–76.
- Amaya F., Decosterd I., Samad T.A., et al.: Diversity of expression of the sensory neuron-specific TTX-resistant voltage-gated sodium ion channels SNS and SNS2. *Mol. Cell. Neurosci.* 2000; **15**: 331–42.
- Andaluz A., Moll X., Abellàn R., et al.: Pharmacokinetics of Buprenorphine after intravenous administration of clinical doses to dogs. *The Vet. J.* 2009; **181**: 299–304.
- Bandell M., Story G.M., Hwang S.W., et al.: Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 2004; **41**: 849–57.
- Bartlett A.J., Lloyd-Jones J.G., Rance M.J., et al. The radioimmunoassay of buprenorphine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1980; **18**: 339–345.
- Blanpied T.A., Clarke R.J., Johnson J.W.: Amantadine inhibits NMDA receptors by accelerating channel closure during channel block. *J Neurosci* 2005; **25**: 3312–22.
- Bloms-Funke P., Gillen C., Schuettler A.J., et al.: Agonistic effects of the opioid buprenorphine on the nociceptin/OFQ receptor. *Peptides* 2000; **21**:1141–1146.

Boas R.A., Villiger J.W.: Clinical actions of fentanyl and buprenorphine. The significance of receptor binding. *Br J Anaesth* 1985; **57**: 192–196.

Bouw M.R., Xie R., Tunblad K., et al.: Blood-brain barrier transport and brain distribution of morphine-6-glucuronide in relation to the antinociceptive effect in rats—pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling. *Br J Pharmacol* 2001; **134**: 1796–1804.

Brodbelt, D.C., Taylor, P.M., Benson, G.J.: A comparison of preoperative morphine and buprenorphine for postoperative analgesia for arthrotomy in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1997; **20**: 284–289.

Brown D.C., Iadarola M.J., Perkowski S.Z., et al.: Physiologic and antinociceptive effects of intrathecal resiniferatoxin in a canine bone cancer model. *Anesthesiology* 2005; **103**: 1052–9.

Brown S.M., Holtzman M.D., Kim T., et al.: Buprenorphine metabolites, Buprenorphine-3-glucuronide and Norbuprenorphine-3-glucuronide, are biologically active. *Anesthesiology* 2011; V; **115 (6)**: 1251 – 1260.

Bruce R.D., McCance-Katz E., Kharasch E.D., Moody D.E., Morse G.D.: Pharmacokinetic interactions between buprenorphine and antiretroviral medications. *Clin Infect Dis* 2006; **43 (4)**: 216–23.

Budai D., Harasawa I., Fields H.L.: Midbrain periaqueductal gray (PAG) inhibits nociceptive inputs to sacral dorsal horn nociceptive neurons through alpha2-adrenergic receptors. *J Neurophysiol* 1998; **80**: 2244–54.

Bullingham R.E.S., McQuay H.J., Moore A., Bennett M.R.D.:

Buprenorphine kinetics. *Clinical Pharmacokinetics and Therapeutics* 1980; **28**: 667–672.

Butour J.L., Moisand C., Mazarguil H., Mollereau C., Meunier J.C.: Recognition and activation of the opioid receptor-like ORL 1 receptor by nociceptin, nociceptin analogs and opioids. *Eur J Pharmacol* 1997; **321**: 97–103.

Caterina M.J., Rosen T.A., Tominaga M., et al.: A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 1999; **398**: 436–41.

Ceccato, A., Klinkenberg, R., Hubert, P., Strel, B.: Sensitive determination of buprenorphine and its N-dealkylated metabolite norbuprenorphine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003; **32**: 619–631.

Chang Y., Moody D.E.: Glucuronidation of buprenorphine and norbuprenorphine by human liver microsomes and UDPglucuronosyltransferases. *Drug Metab. Lett.* 2009; **3**: 101–7.

Cheng Y., Prusoff W.H.: Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 1973; **22**: 3099–108.

Chiang T-Y., Pao L-H., Hsiong C-H., et al.: Simultaneous determination of Buprenorphine, Norbuprenorphine and Naloxone in Human plasma by LC-MS-MS. *Chromatographia* 2011; **74**: 575-583.

Christoph T., Kgel B., Schiene K., Men M., De Vry J., Friderichs E.: Broad

analgesic profile of buprenorphine in rodent models of acute and chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 2005; **507**: 87–98.

Coller J.K., Christrup L.L., Somogyi A.A.: Role of active metabolites in the use of opioids. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2009; **65**: 121–39.

Concheiro M, Shakleya D.M., Huestis M.A.: Simultaneous quantification of Buprenorphine, Norbuprenorphine, Buprenorphine-glucuronide and Norbuprenorphine-glucuronide in Human umbilical cord by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Forensic Science International* 2009; **188**: 144-151.

Cummins T.R., Sheets P.L., Waxman S.G.: The roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of pain. *Pain* 2007; **131**: 243–57.

Curros-Criado M.M., Herrero J.F.: The antinociceptive effect of systemic gabapentin is related to the type of sensitization-induced hyperalgesia. *J. Neuroinflammation* 2007; **4**: 15.

Dahan A., Yassen A., Romberg R., Sarton E., Teppema L., Olofsen E., Danhof M.: Buprenorphine induces ceiling in respiratory depression but not in analgesia. *Br. J. Anaesth.* 2006; **96**: 627–32.

Dahan A., Yassen A., Bijl H., Romberg R., Sarton E., Teppema L., Olofsen E., Danhof M.: Comparison of the respiratory effects of intravenous buprenorphine and fentanyl in humans and rats. *Br. J. Anaesth.* 2005; **94**: 825–34.

Darland T., Heinricher M.M., Grandy D.K.: Orphanin FQ/ nociceptin: a role in pain and analgesia, but so much more. *Trends Neurosci* 1998; **21**: 215–221.

DeLeo J.A.: Basic science of pain. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2006; **88** (2): 58–62.

Dobbins, S., Brown, N.O., Shofer, F.S.: Comparison of the effects of buprenorphine, oxymorphone hydrochloride, and ketoprofen for postoperative analgesia after onychectomy or onychectomy and sterilization in cats. *Journal of American Animal Hospital Association* 2002; **38**: 507–514.

Doubell T.P., Mannion R.J., Woolf C.J.: The dorsal horn: state dependent sensory processing, plasticity and the generation of pain. In: Wall PD, Melzack R, editors. *The textbook of pain*. 4th edition. Edinburgh (UK): Churchill Livingstone; 1999. p. 165–78.

Ebling W.F., Lee E.N., Stanski D.R.: Understanding pharmacokinetics and pharmacodynamics through computer stimulation: I. The comparative clinical profiles of fentanyl and alfentanil. *Anesthesiology* 1990; **72**: 650–658.

Eisenach J.C., De Kock M., Klimscha W.: Alpha(2) adrenergic agonists for regional anesthesia. A clinical review of clonidine (1984–1995). *Anesthesiology* 1996; **85**: 655–74.

Elkader, A., Sproule, B.: Buprenorphine. Clinical pharmacokinetics in the treatment of opioid dependence. *Clinical Pharmacokinetics* 2005; **44**: 61–680.

Fan J., Brown S.M., Tu Z., Kharasch E.D.: Chemical and enzymeassisted syntheses of norbuprenorphine-3-β-D-glucuronide. *Bioconjug. Chem.* 2011; **22**: 752–8.

Fang X., Djouhri L., McMullan S., et al.: TrkA is expressed in nociceptive

neurons and influences electrophysiological properties via Nav1.8 expression in rapidly conducting nociceptors. *J. Neurosci.* 2005; **25**: 4868–78.

Ferreira J., da Silva G.L., Calixto J.B.: Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Br. J. Pharmacol.* 2004; **141**: 787–94.

Field M.J., Cox P.J., Stott E., et al.: Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage- dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; **103**: 17537–42.

Fields H.L., Emson P.C., Leigh B.K., et al.: Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibres. *Nature* 1980; **284**: 351–3.

Fields H.L., Basbaum A.I.: Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Wall PD, Melzack R, editors. *Textbook of pain*. 4th edition. Edinburgh (UK):Churchill Livingstone; 1999. p. 309–30.

Garrett E.R., Chandran V.R.: Pharmacokinetics of morphine and its surrogates. X: analyses and pharmacokinetics of buprenorphine in dogs. *Biopharm. Drug. Dispos.* 1990; **11**: 311–350.

Geisslinger G., Brune K., Kobal G., Lo'tsch J.: Intravenous morphine-6-glucuronide (M6G) is devoid of analgesic activity in man. *Pain* 1997; **70**: 289–90.

Giordano J.: The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. *Pain Physician* 2005; **8**: 277–90.

Gopal S., Tzeng T.B., Cowan A.: Characterization of the pharmacokinetics

of buprenorphine and norbuprenorphine in rats after intravenous bolus administration of buprenorphine. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002; **15**: 287–293.

Gottrup H., Juhl G., Kristensen A.D., et al.: Chronic oral gabapentin reduces elements of central sensitization in human experimental hyperalgesia. *Anesthesiology* 2004; **101**: 1400–8.

Greffrath W.: The capsaicin receptor. “TRPing” transduction for painful stimuli. *Schmerz* 2006; **20**: 219–25.

Gueye P.N., Borron S.W., Risdé P., Monier C., Buneaux F., Debray M., Baud F.J.: Lack of effect of single high doses of buprenorphine on arterial blood gases in the rat. *Toxicol. Sci.* 2001; **62**: 148–54.

Gunthorpe M., Chizh B.: Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway", *Drug Discovery Today* 2009; **14**: 56–67.

Guo T.Z., Jiang J.Y., Buttermann A.E., et al.: Dexmedetomidine injection into the locus ceruleus produces antinociception. *Anesthesiology* 1996; **84**: 873–81.

Hand, C.W., Sear, J.W., Uppington, J., Ball, M.J., McQuay, H.J., Moore, R.A.: Buprenorphine disposition in patients with renal impairment. Single and continuous dosing with especial reference to metabolites. *British Journal of Anaesthesia* 1990; **64**: 276–282.

Hand C.W., Baldwin D., Moore R.A., et al.: Radioimmunoassay of buprenorphine with iodine label: analysis of buprenorphine and metabolites in human plasma. *Ann. Clin. Biochem.* 1986; **23**: 47–53.

Hand C.W., Sear J.W., Uppington J., et al.: Buprenorphine disposition in patients with renal impairment: single and continuous dosing, with special reference to metabolites. *Br. J. Anaesth.* 1990; **64**: 276–282.

Hambrook J.M., Rance M.J.: The interaction of buprenorphine with the opiate receptor: lipophilicity as a determining factor in drug-receptor kinetics. In: Kosterlitz HW, ed. *Opiates and endogenous opioid peptides*. Amsterdam: Elsevier, 1976; 295–301.

Hans G., Robert D.: Transdermal buprenorphine: A critical appraisal of its role in pain management. *J. Pain. Res.* 2009; **2**: 117–34.

Hansen B.: Analgesia for the critically ill dog or cat: an update. *Vet. Clin. of north America: Small Animal Practice*; **38 (6)**: p. 1358.

Hansson E.: Could chronic pain and spread of pain sensation be induced and maintained by glial activation? *Acta Physiol. (Oxf)* 2006; **187**: 321–7.

Hara N., Minami T., Okuda-Ashitaka E., et al.: Characterization of nociceptin hyperalgesia and allodynia in conscious mice. *Br. J. Pharmacol.* 1997; **121**: 401–408.

Harris D.S., Mendelson J.E., Lin E.T., et al.: Pharmacokinetics and subjective effects of sublingual buprenorphine, alone or in combination with naloxone: lack of dose proportionality. *Clin. Pharmacokinet* 2004; **43**: 329–340.

Hassan H.E., Myers A.L., Coop A., et al.: Differential involvement of P-glycoprotein (ABCB1) in permeability, tissue distribution, and antinociceptive activity of methadone, buprenorphine, and diprenorphine: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *J. Pharm. Sci.* 2009; **98**: 4928 – 40.

Heel R.C., Brogden R.N., Speight T.M., Avery G.S.: Buprenorphine: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1979; **17**: 81–110.

Hefti F.F., Rosenthal A., Walicke P.A., et al.: Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF. *Trends Pharmacol .Sci.* 2006; **27**: 85–91.

Hendrix P., Hansen B.: Acute pain management. In: Bonagura J, ed. *Kirk's current veterinary therapy: XIII small animal practice*. Philadelphia: WB Saunders, 2000; 57–61.

Ho, S.T., Wang, J., Ho, W., Hu, O.Y.: Determination of buprenorphine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to human and rabbit pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography* 1991; **570**: 339–350.

Hreiche R., Mgarbane B., Pirnay S., Borron S.W., Monier C., Risse P., Milan N., Descatoire V., Pessayre D., Baud F.J.: Dexamethasone hepatic induction in rats subsequently treated with high dose buprenorphine does not lead to respiratory depression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006; **217**: 352–62.

Huang E.J., Reichardt L.F.: Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 2003; **72**: 609–42.

Huang P., Kehner G.B., Cowan A., et al.: Comparison of pharmacological activities of buprenorphine and norbuprenorphine: norbuprenorphine is a potent opioid agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001; **297**: 688–695.

Hutchinson M.R., Bland S.T., Johnson K.W., et al.: Opioid-induced glial activation: mechanisms of activation and implications for opioid analgesia, dependence, and reward. *Scientific World Journal* 2007; **7**: 98–111.

Inturrisi C.E.: Clinical pharmacology of opioids for pain. *Clin. J. Pain* 2002; **18**: 3–13.

Jensen M.L., Foster D., Upton R., Grant C., Martinez A., Somogyi A.: Comparison of cerebral pharmacokinetics of buprenorphine and norbuprenorphine in an *in vivo* sheep model. *Xenobiotica* 2007; **37**: 441–57.

Johnson R.E., Fudala P.J., Payne R.: Buprenorphine: considerations for pain management. *J. Pain Symptom Manage* 2005; **29**: 297–326.

Kajander K.C., Giesler G.J. Jr.: Responses of neurons in the lateral cervical nucleus of the cat to noxious cutaneous stimulation. *J. Neurophysiol.* 1987; **57**: 1686–704.

Kawamata T., Sato Y., Niiyama Y., et al.: Pain management after lumbar spinal fusion surgery using continuous subcutaneous infusion of buprenorphine. *J. Anesth.* 2005; **19**: 199-203.

Kawamoto K., Aoki J., Tanaka A., et al.: Nerve growth factor activates mast cells through the collaborative interaction with lysophosphatidylserine expressed on the membrane surface of activated platelets. *J. Immunol.* 2002; **168**: 6412–9.

Khroyan T.V., Polgar W.E., Cami-Kobeci G., Husbands S.M., Zaveri N.T., Toll L.: The first universal opioid ligand, (2*S*)-2-[(5*R*,6*R*,7*R*,14*S*)-*N*-cyclopropylmethyl-4,5-epoxy-6,14-ethano-3-hydroxy-6-methoxymorphinan-7-yl]-3,3dimethylpentan-2-ol(BU08028): Characterization of the *in vitro* profile and *in vivo* behavioral effects in mouse models of acute pain and cocaineinduced reward. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011; **336**: 952–61.

Khroyan T.V., Polgar W.E., Jiang F., Zaveri N.T., Toll L.:

Nociceptin/orphanin FQ receptor activation attenuates antinociception induced by mixed nociceptin/orphanin FQ/mu-opioid receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009; **331**: 946–53.

Kobayashi K., Yamamoto T., Chiba K., Tani M., Shimada N., Ishizaki T., Kuroiwa Y.: Human buprenorphine N-dealkylation is catalyzed by cytochrome P450 3A4. *Drug Metab. Dispos.* 1998; **26**: 818–21.

Krotscheck U., Boothe D.M., Little A.A.: Pharmacokinetics of buprenorphine following intravenous administration in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 2008; **69**: 722-727.

Kym, P.R.; Kort, M.E.; Hutchins, C.W.: Analgesic potential of TRPV1 antagonists. *Biochemical Pharmacology* 2009; **78**: 211–216.

Lambers T.T., Weidema A.F., Nilius B., et al.: Regulation of the mouse epithelial Ca_v2(1) channel TRPV6 by the Ca(2+)-sensor calmodulin. *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 28855–61.

Lascelles B.D., Capner C.A., Waterman-Pearson A.E.: Current British veterinary attitudes to perioperative analgesia for cats and small mammals. *Vet. Rec.* 1999; **145**: 601–604.

Levine J.D., Reichling D.B.: Peripheral mechanisms of inflammatory pain. In: Wall PD, Melzack R, editors. *Textbook of pain*. 4th edition. Edinburgh (UK): Churchill Livingstone; 1999. p. 59–84.

Lo`tsch J.: Opioid metabolites. *J. Pain Symptom Manage* 2005; **29**: 10–24.

Lutfy K., Cowan A.: Buprenorphine: A unique drug with complex pharmacology. *Curr. Neuropharmacol.* 2004; **2**: 395–402.

Lutfy K., Eitan S., Bryant C.D., Yang Y.C., Saliminejad N., Walwyn W., Kieffer B.L., Takeshima H., Carroll F.I., Maidment N.T., Evans C.J.: Buprenorphine-induced antinociception is mediated by mu-opioid receptors and compromised by concomitant activation of opioid receptor-like receptors. *J. Neurosci.* 2003; **23**: 10331–7.

Martinez, E.A., Hartsfield, S.M., Melendez, L.D., Matthews, N.S., Slater, M.R.: Cardiovascular effects of buprenorphine in anaesthetized dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1997; **58**: 1280–1284.

Mason P.: Ventromedial medulla: pain modulation and beyond. *J. Comp. Neurol.* 2005; **493**: 2–8.

McKelvey, D., Hollingshead, K.W., 2000. Analgesia. In: *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 3rd ed. Mosby. St Louis, Missouri, p. 315–350.

Melzack R.: From the gate to the neuromatrix. *Pain* 1999; **6**: 121–6.

Melzack R.: Evolution of the neuromatrix theory of pain. *Pain Pract* 2005; **5**: 85–94.

Mgarbane B., Marie N., Pirnay S., Borron S.W., Gueye P.N., Rilde P., Monier C., Noble F., Baud F.J.: Buprenorphine is protective against the depressive effects of norbuprenorphine on ventilation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006; **212**: 256–67.

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.

Mok M.S., Lippmann M., Steen S.N.: Multidose/observational, comparative

clinical analgetic evaluation of buprenorphine. J. Clin. Pharmacol. 1981; **21**: 323–329.

Montana M.C., Cavallone L.F., Stubbert K.K., Stefanescu A.D., Kharasch E.D., Gereau R.W. 4th: The metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonist fenobam is analgesic and has improved *in vivo* selectivity compared with the prototypical antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2009; **330**: 834 – 43.

Moody D.E., Chang Y., Huang W., McCance-Katz E.F.: The *in vivo* response of novel buprenorphine metabolites, M1 and M3, to antiretroviral inducers and inhibitors of buprenorphine metabolism. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2009; **105**: 211–5.

Moody D.E., Slawson M.H., Strain E.C., Laycock J.D., Spanbauer A.C., Foltz R.L.: A liquid chromatographic-electrospray ionization-tandem mass spectrometric method for determination of buprenorphine, its metabolite, norbuprenorphine, and a coformulant, naloxone, that is suitable for *in vivo* and *in vitro* metabolism studies. Anal. Biochem. 2002; **306**: 31–9.

Muir W.W., Hubbell J.A.E., Skarda R.T., et al. Handbook of veterinary anesthesia. 3rd ed. St Louis: Mosby Inc, 2000.

Nicol G.D., Vasko M.R.: Unraveling the story of NGF-mediated sensitization of nociceptive sensory neurons: ON or OFF the Trks? Mol Interv 2007; **7**: 26–41.

Nolan, A., Livingston, A., Waterman, A.E.: Investigation of the antinociceptive activity of buprenorphine in sheep. British Journal of Pharmacology 1987; **92**: 527–533.

Ohtani M., Kotaki H., Sawada Y., et al.: Comparative analysis of

buprenorphine- and norbuprenorphine-induced analgesic effects based on pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995; **272**: 505–510.

Ohtani M., Kotaki H., Nishitateno K., Sawada Y., Iga T.: Kinetics of respiratory depression in rats induced by buprenorphine and its metabolite, norbuprenorphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997; **281**: 428–33.

Omoigui S.: The biochemical origin of pain—proposing a new law of pain: the origin of all pain is inflammation and the inflammatory response. Part 1 of 3 — a unifying law of pain. *Med Hypotheses* 2007; **69**: 70–82.

Omoigui S.: The biochemical origin of pain: the origin of all pain is inflammation and the inflammatory response. Part 2 of 3—inflammatory profile of pain syndromes. *Med Hypotheses* 2007; **69**: 1169–78.

Papich, M.G.: Pharmacologic considerations for opiate analgesia and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2000. **30**, 815–837.

Peterlin Z., Chesler A., Firestein S.: A painful TRP can be a bonding experience. *Neuron* 2007; **53**: 635–8.

Picard N., Cresteil T., Djebli N., Marquet P.: *In vitro* metabolism study of buprenorphine: Evidence for new metabolic pathways. *Drug. Metab. Dispos.* 2005; **33**: 689–95.

Pontani R.B., Vadlamani N.L., Misra A.L.: Disposition in the rat of buprenorphine administered parenterally and as a subcutaneous implant. *Xenobiotica* 1985; **15**: 287–297.

Reinscheid R.K., Nothacker H.P., Bourson A., et al.: Orphanin FQ: a

neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 1995; **270**: 792–794.

Ritter J.K.: Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem. Biol. Interact.* 2000; **129**: 171–93.

Robertson S.A., Lascelles B.D., Taylor P.M., et al.: PK-PD modeling of buprenorphine in cats: intravenous and oral transmucosal administration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2005; **28**: 453–460.

Robertson S.A., Taylor P.M., Sear J.W., et al.: Relationship between plasma concentrations and analgesia after intravenous fentanyl and disposition after other routes of administration in cats. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2005; **28**: 87–93.

Robertson, S.A., Taylor, P.M., Sear, J.W.: Systemic uptake of buprenorphine by cats after oral mucosal administration. *Veterinary Record* 2003; **31**: 578–675.

Robinson T.M., Kruse-Elliott K.T., Markel M.D., et al.: A comparison of transdermal fentanyl versus epidural morphine for analgesia in dogs undergoing major orthopedic surgery. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1999; **35**: 95–100.

Rogers J.F., Nafziger A.N., Bertino J.S. Jr.: Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. *Am. J. Med.* 2002; **113**: 746–750.

Rouguieg K., Picard N., Sauvage F.L., Gaulier J.M., Marquet P.: Contribution of the different UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms to buprenorphine and norbuprenorphine metabolism and relationship with the main UGT polymorphisms in a bank of human liver microsomes. *Drug*

Metab. Dispos. 2010; **38**: 40–5.

Samad T.A., Moore K.A., Sapirstein A., et al.: Interleukin-1beta-mediated induction of COX-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 2001; **410**: 471–5.

Schmidt H., Vormfelde S.V., Walchner-Bonjean M., Klinder K., Freudenthaler S., Gleiter C.H., Gundert-Remy U., Skopp G., Aderjan R., Fuhr U.: The role of active metabolites in dihydrocodeine effects. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2003; **41**: 95–106.

Shiue C.Y., Bai L.Q., Teng R.R., et al.: A comparison of the brain uptake of N-(cyclopropyl[11C]methyl)norbuprenorphine([11C]buprenorphine) and N(cyclopropyl[11C]methyl)nordiprenorphine ([11C]diprenorphine) in baboon using PET. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B* 1991; **18**: 281–288.

Skingle M., Tyers M.B.: Further studies on opiate receptors that mediate antinociception: tooth pulp stimulation in the dog. *Br. J. Pharmacol.* 1980; **70**: 323–327.

Smith, L.J., Kwang-An, Yu J.: Comparison of epidural buprenorphine with epidural morphine for postoperative analgesia in dogs. *Veterinary Anesthesia and Analgesia* 2000; **27**: 97–111.

Smith, L.J., Kwang-An, Yu J.: A comparison of epidural buprenorphine with epidural morphine for postoperative analgesia following stifle surgery in dogs. *Veterinary Anesthesia and Analgesia* 2001; **28**, 87–96.

South S.M., Kohno T., Kaspar B.K., et al.: A conditional deletion of the NR1 subunit of the NMDA receptor in adult spinal cord dorsal horn reduces NMDA currents and injury-induced pain. *J. Neurosci.* 2003; **23**: 5031–40.

Spagnolo B., Calo G., Polgar W.E., Jiang F., Olsen C.M., Berzetei-Gurske I., Khroyan T.V., Husbands S.M., Lewis J.W., Toll L., Zaveri N.T.: Activities of mixed NOP and mu-opioid receptor ligands. *Br. J. Pharmacol.* 2008; **153**: 609-19.

Stein C., Schafer M., Machelska H.: Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat. Med.* 2003; **9**: 1003–8.

Stubhaug A., Breivik H., Eide P.K., et al.: Mapping of punctuate hyperalgesia around a surgical incision demonstrates that ketamine is a powerful suppressor of central sensitization to pain following surgery. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1997; **41**: 1124–32.

Taylor, P.M., Houlton, J.E.F.: Postoperative analgesia in the dog: a comparison of morphine, buprenorphine and pentazocine. *Journal of Small Animal Practice* 1984; **25**: 437–451.

Taylor P.M., Robertson S.A., Dixon M.J., et al.: Morphine, pethidine and buprenorphine disposition in the cat. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2001; **24**: 391–398.

Taylor, P.M., Robertson, S.A., Dixon, M.J., Ruprah, M., Sear, J.W., Lascelles, B.D., Waters, C., Bloomfield, M.: Morphine, pethidine and buprenorphine disposition in the cat. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2001; **24**: 391–398.

Thurmon, J.C., Tranquili, W.J., Benson, G.J.: Preanesthetic and anesthetic adjuncts. In: *Essentials of Small Animal Anesthesia and Analgesia*, 3rd ed. 1999. Williams and Wilkins, Baltimore, p. 187–194.

Tigerstedt I., Tammisto T.: Double-blind, multiple-dose comparison of

buprenorphine and morphine in postoperative pain. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1980; **24**: 462–468.

Tournier N., Chevillard L., Megarbane B., Pirnay S., Scherrmann J.M., Declves X.: Interaction of drugs of abuse and maintenance treatments with human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2). *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2010; **13**: 905–15.

Toutain P.L., Bousquet-Melou A.: Plasma clearance. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2004; **27**: 415–425.

Toutain P.L., Bousquet-Melou A.: Plasma terminal half-life. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2004; **27**: 427–439.

Toutain P.L., Bousquet-Melou A.: Free drug fraction vs free drug concentration: a matter of frequent confusion. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2002; **25**: 460–463.

Tracey I., Mantyh P.W.: The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron* 2007; **55**: 377–91.

Tusell, J.M., Andaluz, A., Prandi, D., Costa, C., Garcia, F.: Effects of epidural anaesthesia- analgesia on intravenous anaesthesia with propofol. *The Veterinary Journal* 2005; **169**: 108–112.

Van Dorp E.L., Morariu A., Dahan A.: Morphine-6-glucuronide: Potency and safety compared with morphine. *Expert Opin. Pharmacother.* 2008; **9**: 1955– 61.

Vanderah T.W.: Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain. *Clin. J. Pain* 2010; **26**: 10–5.

Velazquez K.T., Mohammad H., Sweitzer S.M.: Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. *Pharmacol. Res.* 2007; **55**: 578–89.

Verri W.A. Jr., Cunha T.M., Parada C.A., et al.: Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol. Ther.* 2006; **112**: 116–38.

Wagner, A.E.: Opioids. In: Gayner, J.S., Muir, W. (Eds.), *Handbook of Veterinary Pain Management* 2002. Mosby. St Louis, Missouri, p. 164–184.

Walsh S.L., Preston K.L., Stitzer M.L., Cone E.J., Bigelow G.E.: Clinical pharmacology of buprenorphine: Ceiling effects at high doses. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1994; **55**: 569–80.

Wang H., Ehnert C., Brenner G.J., et al.: Bradykinin and peripheral sensitization. *Biol. Chem.* 2006; **387**: 11–4.

Wang H., Woolf C.J.: Pain TRPs. *Neuron* 2005;46:9–12. 8. Levine JD, Alessandri-Haber N. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim. Biophys. Acta* 2007; **1772**: 989–1003.

Wang R.I., Johnson R.P., Robinson N., et al.: The study of analgesics following single and repeated doses. *J. Clin. Pharmacol.* 1981; **21**: 121–125.

Watkins L.R., Hutchinson M.R., Milligan E.D., et al.: “Listening” and “talking” to neurons: implications of immune activation for pain control and increasing the efficacy of opioids. *Brain Res. Rev.* 2007; **56** (1): 148–59.

Watkins L.R., Hutchinson M.R., Johnston I.N., et al.: Glia: novel counter-regulators of opioid analgesia. *Trends Neurosci.* 2005; **28**: 661–9.

Watson, A.P., Nicholson, A., Church, D.B., Pearson, M.R.: Use of anti-

inflammatory and analgesic drugs in dogs and cats. *Australian Veterinary Journal* 2006; **74**: 201–210.

Watson A.D., Nicholson A., Church D.B., et al.: Use of antiinflammatory and analgesic drugs in dogs and cats. *Aust. Vet. J.* 1996; **74**: 203–210.

Willis W.D. Jr.: The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain. *Brain Res. Rev.* 2007; **55**: 297–313.

Woolf C.J., Ma Q.: Nociceptors—noxious stimulus detectors. *Neuron* 2007; **55**: 353-64.

Woolf C.J., Salter M.W.: Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2000; **288**: 1765–9.

Woolf C.J., American College of Physicians, American Physiological Society.. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann. Intern. Med.* 2004; **140**: 441–51.

Xie W.: Ion channels in pain transmission. *Int. Anesthesiol. Clin.* 2007; **45**: 107–20.

Xu H., Wang X., Partilla J.S., Bishop-Mathis K., Benaderet T.S., Dersch C.M., Simpson D.S., Prisinzano T.E., Rothman R.B.: Differential effects of opioid agonists on G protein expression in CHO cells expressing cloned human opioid receptors. *Brain Res. Bull.* 2008; **77**: 49 –54.

Yassen A., Kan J., Olofsen E., Suidgeest E., Dahan A., Danhof M.: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the respiratory depressant effect of norbuprenorphine in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; **321**: 598 – 607.

Yassen A., Olofsen E., Dahan A., et al.: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of buprenorphine and fentanyl in rats: role of receptor equilibration kinetics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005; **313**: 1136–1149.

Yassen A., Olofsen E., Romberg R., et al.: Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of buprenorphine in healthy volunteers. *Anesthesiology* 2006; **104**: 1232–1242.

Yoshimura M., Furue H.: Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *J. Pharmacol. Sci.* 2006; **101**: 107–17.

Youell P.D., Wise R.G., Bentley D.E., et al.: Lateralisation of nociceptive processing in the human brain: a functional magnetic resonance imaging study. *Neuroimage* 2004; **23**: 1068–77.

Yu S., Zhang X., Sun Y., et al.: Pharmacokinetics of buprenorphine after intravenous administration in the mouse. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2006; **45**: 12–16.

Zacny J.P., Conley K., Galinkin J.: Comparing the subjective, psychomotor and physiological effects of intravenous buprenorphine and morphine in healthy volunteers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997; **282**: 1187–97.

Zhu J., Yin J., Law P.Y., Claude P.A., Rice K.C., Evans C.J., Chen C., Yu L., Liu-Chen L.Y.: Irreversible binding of cis-($_$)-3-methylfentanyl isothiocyanate to the delta opioid receptor and determination of its binding domain. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 1430–4.