Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Katarzyna Ciapała

Wpływ farmakologicznej modulacji szlaku kynureninowego oraz wybranych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych na objawy bólu neuropatycznego i efektywność leków opioidowych w modelach przedklinicznych

Influence of pharmacological modulation of the kynurenine pathway and selected intracellular signaling pathways on neuropathic pain symptoms and effectiveness of opioid drugs in preclinical models

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Farmakologii Bólu

Promotor:
Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika

Badania opisane w niniejszej pracy zostały zrealizowane w ramach projektów grantowych Narodowego Centrum Nauki –
SONATA 2015/17/D/NZ4/02284 i OPUS 2021/43/B/NZ7/00230

Kraków, 2026

Pracę tę dedykuję
Moim Najbliższym

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania

Pani Promotor, ***Prof. dr hab. Joannie Mika***
za możliwość realizacji badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej, przekazaną wiedzę i doświadczenie, niezliczone dyskusje oraz okazaną życzliwość, cierpliwość i wiarę w mój potencjał naukowy

Dr hab. Ewelinie Rojewskiej – Mendel
pod której opieką zaczynałam swoją naukową przygodę,
za możliwość uczestniczenia w badaniach nad rolą szlaku kynureninowego,
wprowadzenie mnie w praktyczne aspekty pracy badawczej,
wsparcie merytoryczne i ogromną serdeczność

Koleżankom z Zakładu Farmakologii Bólu
za pomoc w przeprowadzeniu badań i przemiłą atmosferę pracy
Kasi, Anusi i Agatce
za uśmiech i zrozumienie w każdej sytuacji,
bez Was ten czas nie byłby tak wesoły i inspirujący

Moim Rodzicom i Braciom
za bezgraniczną miłość, wsparcie, opiekę i wiarę we mnie

Brunonowi i Jego Mamie Elżbiecie
za ciepło, nieustanną troskę i obecność
w najtrudniejszych momentach

Julkowi
za to, że nauczył mnie podążać za marzeniami

Dolorem sedare opus divinum est
Hipokrates

Spis treści

ALFABETYCZNY WYKAZ SKRÓTÓW ... 6

STRESZCZENIE ... 7

ABSTRACT ... 10

SPIS PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD DOKTORATU ... 13

1. WSTĘP ... 14

1.1. Ból i procesy nocycepcji ... 14

1.2. Ból neuropatyczny - charakterystyka ... 16

1.3. Ból neuropatyczny – mechanizm powstawania ... 17

1.4. Rola szlaku kynureninowego w bólu neuropatycznym ... 20

1.5. Rola wybranych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych w bólu neuropatycznym ... 22

1.6. Terapia bólu ze szczególnym uwzględnieniem bólu neuropatycznego ... 25

2. CEL BADAŃ ... 30

3. METODOLOGIA BADAŃ ... 31

4. GŁÓWNE ZAGADNIENIA DOKTORATU ... 33

4.1. Rola szlaku kynureninowego w patogenezie bólu neuropatycznego – ***praca przeglądowa*** **Ciapała i wsp.,** ***International Journal of Molecular Sciences*****, 2021** ... 33

4.2. Zbadanie wpływu farmakologicznej modulacji szlaku kynureninowego na nadwrażliwość oraz przeciwbólowe efekty leków opioidowych w mysim modelu bólu neuropatycznego– ***praca oryginalna*** **Ciapała i wsp.,** ***Toxicology and Applied Pharmacology*****, 2023** ... 52

4.3. Rola wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych ze szczególnym uwzględnieniem kinaz MAP w patogenezie bólu neuropatycznego – ***praca przeglądowa*** **Ciapała i Mika,** ***Pharmaceuticals*****, 2023** ... 67

4.4. Zbadanie wpływu fisetyny, peiminy, astaksantyny, artemizyny, bardoksolonu metylu i 740 Y-P na nadwrażliwość oraz przeciwbólowe działanie leków opioidowych w mysim modelu bólu neuropatycznego – ***praca oryginalna*** **Ciapała i wsp.,** ***International Journal of Molecular Sciences*****, 2023** ... 92

4.5. Zbadanie wpływu wielokrotnych dootrzewnowych podań astaksantyny na nadwrażliwość oraz rozwój tolerancji morfinowej u myszy w modelu bólu neuropatycznego – ***praca oryginalna*** **Ciapała i wsp.,** ***Neurotherapeutics*****, 2025** ... 114

4.6. Zbadanie wpływu wielokrotnych dootrzewnowych podań astaksantyny na nadwrażliwość oraz rozwój tolerancji morfinowej w mysim modelu neuropatii cukrzycowej – ***praca oryginalna*** **Ciapała i wsp.,** ***Pharmacological Reports*****, 2024** ... 135

5. DYSKUSJA ... 153

6. PODSUMOWANIE NAJWAŻNIEJSZYCH WYNIKÓW ... 168

7. WNIOSKI KOŃCOWE ... 169

9. SPIS WSZYTSKICH PUBLIKACJI ... 189

10. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW ... 193

11. ZGODY II LOKALNEJ KOMISJI ETYCZNEJ ... 199

ALFABETYCZNY WYKAZ SKRÓTÓW

AhR	receptor węglowodorów aromatycznych; ang. *aryl hydrocarbon receptor*
AKT	kinaza białkowa B; ang. *protein kinase B*
AMPA	kwas alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy; ang. *alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid*
ANOVA	analiza wariancji; ang. *analysis of variance*
ARE	element odpowiedzi antyoksydacyjnej; ang. *antioxidant response element*
CCL	ligand chemokinowy z rodziny CC-, ang. *CC- motif ligand*
CX3CL	ligand chemokinowy z rodziny CX3C-; ang. *CX3C- motif ligand*
CXCL	ligand chemokinowy z rodziny CXC-; ang. *CXC- motif ligand*
CGRP	peptyd związany z genem kalcytoniny; ang. *calcitonin gene-related peptide*
DOR	receptor opioidowy typu δ; ang. *δ opioid receptor*
ERK	kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym; ang. *extracellular signal-regulated kinase*
GABA	kwas ɣ-aminomasłowy; ang. *ɣ-aminobutyric acid*
GFAP	kwaśne białko włókienkowe; ang. *glial fibrillary acidic protein*
GPCR	receptor związany z białkiem G; ang. *G protein–coupled receptor*
IASP	Międzynarodowe Towarzystwo Badania Bólu; ang. *International Association for the Study of Pain*
IBA-1	domena wiążąca wapń 1; ang. *ionized calcium-binding adapter molecule 1*
IDO	2,3-dioksygenaza indoloaminowa; ang. *indoleamine 2,3-dioxygenase*
IL	interleukina; ang. *interleukin*
iNOS	indukowalna syntaza tlenku azotu; ang. *inducible nitric oxide synthases*
JNK	c-Jun N-kinaza końcowa; ang. *c-Jun N-terminal kinase*
KAT	aminotransferaza kynureninowa; ang. *kynurenine aminotransferase*
KMO	3-monooksygenaza kynureninowa; ang. *kynurenine 3-monooxygenase*
KOR	receptor opioidowy typu κ; ang. *κ opioid receptor*
MAPK	kinazy aktywowane mitogenami; ang. *mitogen-activated protein kinases*
MMP-9	metaloproteinaza macierzy 9; ang. *matrix metalloproteinase 9*
MOR	receptor opioidowy typu μ; ang. *μ opioid receptor*
NF-κB	jądrowy czynnik kappa B; ang. *nuclear factor kappa B*
NMDA	kwas N-metylo-D-asparaginowy; ang. *N-methyl-D-aspartate*
Nrf2	jądrowy czynnik transkrypcyjny 2 pochodzenia erytroidalnego typu 2; ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
OIH	hiperalgezja indukowana opioidami; ang. *opioid-induced hyperalgesia*
p38	kinaza aktywowana mitogenami p38; ang. *p38 mitogen-activated protein kinase*
PI3K	kinaza 3-fosfatydyloinozytolu; ang. *phosphatidylinositide 3-kinase*
ROS	reaktywne formy tlenu; ang. *reactive oxygen species*
SNRI	inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny; ang. s*erotonin norepinephrine reuptake inhibitors*
TCA	trójcykliczne leki przeciwdepresyjne; ang. *tricyclic antidepressants*
TDO	2,3-dioksygenaza tryptofanową; ang. *tryptophan 2,3-dioxygenase*
TNFα	czynnik martwicy nowotworu alfa; ang. *tumor necrosis factor alfa*
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia; ang. *World Health Organization*
XCL	ligand chemokinowy z rodziny XC-; ang. *chemokine (XC- motif) ligand*

STRESZCZENIE

Ból neuropatyczny, będący konsekwencją uszkodzenia lub choroby somatosensorycznego układu nerwowego, traci fizjologiczną funkcję ostrzegawczą i przekształca się w uporczywą dolegliwość, znacząco obniżając jakość życia pacjentów. Niezwykle złożone mechanizmy leżące u podstaw jego powstawania oraz różnorodność objawów sprawiają, że zarówno diagnostyka, jak i leczenie stanowią ogromne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Pomimo dostępności szerokiego spektrum leków przeciwbólowych oraz metod terapii niefarmakologicznych, u wielu pacjentów nie udaje się uzyskać satysfakcjonującej ulgi w bólu ani perspektyw na poprawę. Wynika to z faktu, że pomimo intensywnego rozwoju badań podstawowych i klinicznych, wiedza dotycząca mechanizmów powstawania i utrzymywania się bólu neuropatycznego nadal pozostaje niepełna.

W literaturze z ostatnich lat coraz częściej podkreśla się, że w rozwoju neuropatii istotną rolę odgrywają nie tylko neurony, lecz również komórki glejowe. Zagadnienie to od kilku lat stanowi przedmiot badań prowadzonych w Zakładzie Farmakologii Bólu Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk. Dotychczas wykazano między innymi, że minocyklina, substancja hamująca aktywację, infiltrację i proliferację mikrogleju oraz makrofagów, obniża nadwrażliwość w zwierzęcych modelach bólu neuropatycznego. Efekt ten wiąże się z jej wpływem na poziom kynureninazy 3-monooksygenowej (KMO), jednego z kluczowych enzymów szlaku kynureninowego, oraz kinazy p38 należącej do grupy kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK) w rdzeniu kręgowym. Zagadnienia te, obejmujące rolę szlaku kynureninowego w bólu neuropatycznym, a także analizę potencjału przeciwbólowego związków o wielokierunkowym mechanizmie działania, modulujących wybrane wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, zostały omówione w dwóch pracach przeglądowych wchodzących w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej **Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2021 oraz Ciapała i Mika, *Pharmaceuticals*, 2023**.

W obliczu rosnącej potrzeby opracowania skuteczniejszych metod leczenia bólu neuropatycznego, badania przeprowadzone w ramach tej dysertacji miały na celu określenie znaczenia farmakologicznej modulacji szlaku kynureninowego oraz wybranych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych w nadwrażliwości na bodźce, jak również w odpowiedzi behawioralnej po podaniu leków opioidowych (morfiny, buprenorfiny i oksykodonu) modelach bólu neuropatycznego. Eksperymenty prowadzone były przy wykorzystaniu środków statutowych Zakładu Farmakologii Bólu Instytutu Farmakologii PAN oraz w oparciu o finansowanie uzyskane z Narodowego Centrum Nauki, w ramach projektów SONATA 2015/17/D/NZ4/02284 i OPUS 2021/43/B/NZ7/00230. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w 4 pracach oryginalnych - **Ciapała i wsp., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023, *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, *Pharmacological Reports*, 2024, *Neurotherapeutics*, 2025**.

Doświadczenia wykonywano zarówno na samcach jak i samicach myszy Albino Swiss, zgodnie z wytycznymi Międzynarodowego Towarzystwa Badania Bólu (*International Association for the Study of Pain*), Narodowych Instytutów Zdrowia (*National Institutes of Health*) oraz II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach działającej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie (uchwały: 333/2017, 267/2020; 218/2020, 319/2021, 99/2022; 252/2023, 128/2023, 124/2024; 75/2023, 18/2023, 153/2023, 242/2024, 243/2024). Zastosowano dwa modele bólu neuropatycznego: model uszkodzenia mechanicznego,

polegający na jednostronnym luźnym podwiązaniu nerwu kulszowego, a także model neuropatii cukrzycowej, wywoływany jednorazowym podaniem streptozotocyny. Badane substancje podawano różnymi drogami: podpajęczynówkową, dootrzewnową oraz dożylną. Stopień nasilenia/złagodzenia objawów nadwrażliwości dotykowej i termicznej oceniano odpowiednio za pomocą testów behawioralnych von Freya i zimnej płytki, natomiast funkcje motoryczne w teście pręta obrotowego. Równolegle przeprowadzono badania *ex vivo*, analizując ekspresję mRNA i białka w odcinku lędźwiowym rdzenia kręgowego (L4–L6) przy zastosowaniu technik RT-qPCR oraz Western blot. Do obliczenia istotności statystycznej wykorzystano test t-Studenta oraz jedno- i/lub dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z odpowiednimi poprawkami *post-hoc*.

W początkowych badaniach zaobserwowano, że po podwiązaniu nerwu kulszowego u myszy dochodzi do wzrostu ekspresji mRNA genów kodujących enzymy: *Kmo*, kynureninazę (*Kynu*) oraz oksydazę 3-hydroksyantranilinową (*Haoo*), które ukierunkowują szlak kynureninowy na produkcję neurotoksycznego metabolitu, kwasu chinolinowego. Eksperymenty farmakologiczne dowiodły, że zarówno podanie podpajęczynówkowe UPF648 (inhibitora KMO), jak i L-kynureniny (centralnego metabolitu tego szlaku), prowadzi do zmniejszenia nadwrażliwości dotykowej i termicznej. Ponadto zastosowanie tych związków w skojarzeniu z lekami opioidowymi wzmacniało efekt przeciwbólowy u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego. Co istotne, L-kynurenina wykazuje również działanie analgetyczne po podaniu dożylnym, które ulega nasileniu w przypadku jednoczesnego zastosowania z minocykliną ***(Toxicology and Applied Pharmacology, 2023)***. ***Modulacja szlaku kynureninowego może zatem stanowić obiecującą strategię w leczeniu bólu neuropatycznego, oferując jednocześnie potencjał do komplementarnego stosowania z istniejącą farmakoterapią, a także możliwość identyfikacji nowych punktów uchwytu.***

Kolejnym etapem badań niniejszej rozprawy doktorskiej stało się określenie i porównanie skuteczności przeciwbólowej różnych nieselektywnych inhibitorów MAPK: peiminy (inhibitora MAPK i NF-κB), fisetyny (inhibitora ERK1/2 i NF-κB, modulatora PI3K), artemizyniny (inhibitora MAPK, aktywatora NF-κB) oraz astaksantyny (inhibitora MAPK, aktywatora Nrf2), a także związków selektywnych - bardoksolonu metylu (aktywatora Nrf2) i 740 Y-P (aktywatora PI3K) - w mysim modelu neuropatii wywołanej podwiązaniem nerwu kulszowego. Po raz pierwszy wykazano, że podpajęczynówkowe podanie peiminy, fisetyny i astaksantyny, ale nie artemizyniny, skutecznie zmniejsza nadwrażliwość dotykową i termiczną. Co istotne, podobne efekty uzyskano w przypadku selektywnej farmakologicznej aktywacji Nrf2 i PI3K. Warto podkreślić, że w podaniach łączonych ze wszystkimi testowanymi lekami opioidowymi to astaksantyna i bardoksolon metylu dają najlepszy efekt przeciwbólowy ***(International Journal of Molecular Sciences, 2023)***. ***Analiza wyników badań behawioralnych wskazała astaksantynę jako najbardziej obiecującą spośród testowanych substancji w zastosowanym modelu neuropatii po podaniu podpajęczynówkowym. Uzyskane rezultaty, w połączeniu z udokumentowanymi w literaturze korzystnymi efektami biologicznymi astaksantyny, stanowiły podstawę do podjęcia dalszych badań w ramach niniejszej rozprawy, ukierunkowanych na ocenę jej potencjalnych zastosowań klinicznych w bólu neuropatycznym.***

Kontynuując eksperymenty, dowiedziono, że również jednorazowe dootrzewnowe podanie astaksantyny obniża nadwrażliwość zarówno u samców jak i u samic po podwiązaniu nerwu kulszowego, a jej wielokrotne podania wywołują długotrwały efekt przeciwbólowy oraz opóźniają

rozwój tolerancji morfinowej. Badania biochemiczne wykazały, że astaksantyna na poziomie rdzenia kręgowego nie wpływa na ekspresję markerów mikrogleju/makrofagów i astrocytów. W oparciu o dalszą analizę zaobserwowano, że na poziomie rdzenia kręgowego astaksantyna zmniejsza ekspresję podjednostki NR2B receptora NMDA. W kolejnych eksperymentach farmakologicznych po raz pierwszy potwierdzono, że blokada Nrf2 poprzez podpajęczynówkowe podanie trigonelliny ogranicza efekt przeciwbólowy astaksantyny, potwierdzając istotną rolę tego czynnika transkrypcyjnego w jej mechanizmie działania. Dalsze badania dowiodły również, że podpajęczynówkowe podanie astaksantyny zapobiega nadwrażliwości wywołanej podaniem kwasu chinolinowego, który jest nie tylko agonistą podjednostek NR2A/B receptora NMDA, lecz także końcowym produktem szlaku kynureninowego (*Neurotherapeutics*, 2025). ***Uzyskane wyniki dostarczają nowych informacji na temat molekularnego podłoża analgetycznego działania astaksantyny, a ponadto podkreślają jej potencjał jako obiecującego środka terapeutycznego w leczeniu bólu neuropatycznego.***

Na podstawie uzyskanych wcześniej rezultatów dokonano również oceny skuteczności astaksantyny w modelu neuropatii cukrzycowej, będącej jednym z najczęstszych powikłań cukrzycy, choroby określanej mianem epidemii XXI wieku. Dowiedziono, że pojedyncze podanie astaksantyny, zarówno podpajęczynówkowe, jak i dootrzewnowe, skutecznie redukuje nadwrażliwość dotykową i termiczną u samców i samic myszy. Co ważne, wielokrotne dootrzewnowe podania zmniejszają nadwrażliwość bólową, częściowo opóźniają rozwój tolerancji morfinowej oraz zapobiegają rozwojowi nadwrażliwości indukowanej tym lekiem opioidowym, przy czym nie obserwowano niekorzystnego wpływu na masę ciała i koordynację ruchową zwierząt (*Pharmacological Reports*, 2024). ***Ból neuropatyczny pozostaje poważnym i trudnym do leczenia powikłaniem cukrzycy, a uzyskane wyniki sugerują, że astaksantyna, charakteryzująca się korzystnym profilem bezpieczeństwa, może w przyszłości stanowić efektywną strategię terapeutyczną również w tym rodzaju neuropatii.***

Podsumowując, wyniki badań przedstawionych w cyklu 6 prac (2 przeglądowych i 4 oryginalnych) wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej wskazują, że zarówno farmakologiczna modulacja szlaku kynureninowego jak i zastosowanie związków będących modulatorami kinaz MAP łagodzą objawy bólu neuropatycznego. Spośród analizowanych substancji astaksantyna została zidentyfikowana jako najbardziej obiecujący związek, wykazujący działanie osłabiające nadwrażliwość na bodźce dotykowe i termiczne w bólu neuropatycznym o zróżnicowanej etiologii, niezależnie od płci. Zasługuje ona na szczególną uwagę, gdyż oprócz modulowania wewnątrzkomórkowych mechanizmów sygnałowych, takich jak kinazy MAP lub czynnik transkrypcyjny Nrf2, może również wpływać na działanie kwasu chinolinowego. Co więcej, jej właściwości przeciwbólowe oraz zdolność do zapobiegania rozwojowi tolerancji morfinowej czynią ją atrakcyjnym kandydatem do zastosowania zarówno w monoterapii, jak i w politerapii bólu neuropatycznego. Warto podkreślić, że najnowsze badania kliniczne potwierdzają skuteczność preparatów zawierających astaksantynę w redukcji bólu w chorobie zwyrodnieniowej i zapaleniu stawów, dodatkowo wzmacniając przesłanki dotyczące jej potencjału terapeutycznego. Przedstawione obserwacje mogą stanowić podstawę do opracowania w przyszłości nowych strategii terapeutycznych, zgodnych z nowoczesnymi koncepcjami uśmierzania bólu neuropatycznego i w dalszej perspektywie przyczyniać się do poprawy jakości życia pacjentów.

ABSTRACT

Neuropathic pain, resulting from damage to or disease of the somatosensory nervous system, is associated with a loss of physiological warning function and is a persistent condition that significantly reduces patients' quality of life. The highly complex mechanisms underlying its development, together with the heterogeneity of clinical manifestations, make both diagnosis and treatment major challenges for modern medicine. Despite the availability of a wide range of analgesic drugs and nonpharmacological therapeutic approaches, satisfactory pain relief and prospects for improvement are not achieved in many patients. This is because, despite intensive advances in basic and clinical research, our understanding of the mechanisms responsible for the development and maintenance of neuropathic pain remains incomplete.

In recent years, the literature has increasingly emphasized that the development of neuropathy involves not only neurons but also glial cells. This issue has been the subject of research for several years at the Department of Pain Pharmacology, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences. Among other findings, it has been shown that minocycline, a substance that inhibits the activation, infiltration and/or proliferation of microglia/macrophages, decreases hypersensitivity in animal models of neuropathic pain. This effect is associated with its influence on the levels of kynurenine 3-monooxygenase (KMO), a key enzyme in the kynurenine pathway, and p38 kinase, a member of the mitogen-activated protein kinase (MAP) family, in the spinal cord. These topics, including the role of the kynurenine pathway in neuropathic pain, as well as the evaluation of the analgesic potential of compounds with multitarget mechanisms modulating specific intracellular signaling pathways, have been discussed in two review articles that are part of the publication series forming the basis of the following doctoral dissertation: **Ciapała et al., *Int J Mol Sci*, 2021 and Ciapała i Mika, *Pharmaceuticals*, 2023**.

In view of the growing need to develop more effective treatments for neuropathic pain, the research presented in this dissertation aimed to determine the significance of pharmacological modulation of the kynurenine pathway and selected intracellular signaling pathways in hypersensitivity, as well as in behavioral response to opioid (morphine, buprenorphine, and oxycodone) administration in models of neuropathic pain. The experiments were financially supported by statutory funds of the Department of Pain Pharmacology, Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, and by the National Science Centre through projects SONATA 2015/17/D/NZ4/02284 and OPUS 2021/43/B/NZ7/00230. The findings reported herein have been published across four original research papers—**Ciapała et al., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023; *International Journal of Molecular Sciences*, 2023; *Pharmacological Reports*, 2024; and *Neurotherapeutics*, 2025.**

Experiments were performed on both male and female Albino Swiss mice in accordance with the guidelines of the International Association for the Study of Pain (IASP), the National Institutes of Health (NIH), and the Second Local Ethical Committee for Animal Experiments operating at the Jerzy Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Krakow. (consent numbers: 333/2017, 267/2020; 218/2020, 319/2021, 99/2022; 252/2023, 128/2023, 124/2024; 75/2023, 18/2023, 153/2023, 242/2024, 243/2024). Two models of neuropathic pain

were employed: a mechanical injury model involving unilateral loose ligation of the sciatic nerve and a diabetic neuropathy model induced by a single administration of streptozotocin. The tested compounds were administered *via* different routes: intrathecal, intraperitoneal, and intravenous. The severity of tactile and thermal hypersensitivity was assessed using the von Frey test and the cold plate test, respectively, while motor function was evaluated using the rotarod test. In parallel, *ex vivo* analyses were performed to examine mRNA and protein expression in the lumbar spinal cord (L4–L6) using RT–qPCR and Western blot techniques. Statistical significance was determined using Student's t test and one- or two-way analysis of variance (ANOVA) with appropriate *post hoc* corrections.

In the early stages of the study, it was observed that chronic constriction injury in mice led to an increase in the mRNA expression of genes encoding the enzymes *Kmo*, kynureninase (*Kynu*), and 3-hydroxyanthranilate oxidase (*Haoo*), which direct the kynurenine pathway toward the production of the neurotoxic metabolite quinolinic acid. Pharmacological experiments demonstrated that both the intrathecal administration of UPF648 (a KMO inhibitor) and L-kynurenine (a central metabolite of this pathway) decrease tactile and thermal hypersensitivity. Furthermore, the combination of these compounds with opioid drugs increased the analgesic effect in mice exposed to nerve injury. Notably, L-kynurenine also exhibited analgesic effects after intravenous administration, which were further potentiated when L-kynurenine was coadministered with minocycline. **(*Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023)**. ***Modulation of the kynurenine pathway may therefore represent a promising strategy for the treatment of neuropathic pain, offering the potential for complementary use with existing pharmacotherapy and the opportunity to identify novel therapeutic targets.***

The next stage of the research presented in this doctoral dissertation involved assessing and comparing the analgesic efficacy of various nonselective MAP kinase inhibitors, such as peimine (a MAPK and NF-κB inhibitor), fisetin (an ERK1/2 and an NF-κB inhibitor, a PI3K modulator), artemisinin (a MAPK inhibitor, an NF-κB activator), and astaxanthin (a MAPK inhibitor, an Nrf2 activator), as well as selective compounds, including bardoxolone methyl (an Nrf2 activator) and 740 Y-P (a PI3K activator), in a mouse model of neuropathy induced by sciatic nerve ligation. For the first time, it was demonstrated that intrathecal administration of peimine, fisetin, and astaxanthin, but not artemisinin, effectively decreased tactile and thermal hypersensitivity. Notably, similar effects were observed following the selective pharmacological activation of Nrf2 and PI3K. Importantly, astaxanthin and bardoxolone methyl produced the most pronounced analgesic effects when coadministered with all the tested opioid drugs. **(*International Journal of Molecular Sciences*, 2023)**. ***Analysis of the results of the behavioral study revealed that among the compounds tested in the applied neuropathy model, astaxanthin was the most promising compound following intrathecal administration. These findings, together with the documented beneficial biological effects of astaxanthin reported in the literature, provide the basis for further investigations within this dissertation, aimed at assessing the potential clinical applications of astaxanthin in neuropathic pain***.

Following this initial experiments, it was shown that a single intraperitoneal administration of astaxanthin also decreased hypersensitivity in both male and female mice

following sciatic nerve ligation, while repeated administration produced a long-lasting analgesic effect and delayed the development of morphine tolerance. Biochemical analyses revealed that at the spinal cord level, astaxanthin does not affect the expression of microglial/macrophage or astrocyte markers. Further analysis revealed that astaxanthin decreases the expression of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord. In subsequent pharmacological experiments, it was demonstrated for the first time that blockade of Nrf2 *via* intrathecal administration of trigonelline attenuated the analgesic effect of astaxanthin, confirming the critical role of this transcription factor in its mechanism of action. Additional studies have also shown that the intrathecal administration of astaxanthin prevents hypersensitivity induced by quinolinic acid, which is not only an agonist of NMDA receptor NR2A/B subunits but also an end-product of the kynurenine pathway (***Neurotherapeutics*, 2025**). ***These results provide new insights into the molecular basis of the analgesic effects of astaxanthin and further highlight its potential as a promising therapeutic agent for the treatment of neuropathic pain***.

On the basis of the previously obtained results, the efficacy of astaxanthin was also evaluated in a model of diabetic neuropathy, one of the most common complications of diabetes—a disease often referred to as the epidemic of the 21st century. Single administration of astaxanthin, both intrathecally and intraperitoneally, effectively decreased tactile and thermal hypersensitivity in male and female mice. Importantly, repeated intraperitoneal administrations decreased pain hypersensitivity, partially delayed the development of morphine tolerance, and prevented the development of opioid-induced hypersensitivity, with no adverse effects on body weight or motor coordination (***Pharmacological Reports*, 2024**). ***Neuropathic pain remains a serious and challenging complication of diabetes, and the results suggest that the use of astaxanthin, with its favorable safety profile, may represent an effective therapeutic strategy for this type of neuropathy in the future.***

In summary, the results presented across the six papers (2 review and 4 original research articles) forming the basis of this doctoral dissertation indicate that both pharmacological modulation of the kynurenine pathway and the use of compounds that act as MAP kinase modulators alleviate the symptoms of neuropathic pain. Among the substances analyzed, astaxanthin was identified as the most promising compound, as it can decrease tactile and thermal hypersensitivity in mice with neuropathic pain of diverse etiologies, regardless of sex. This compound warrants particular attention, as in addition to modulating intracellular signaling mechanisms, such as MAP kinases and the transcription factor Nrf2, it may influence the actions of quinolinic acid. Moreover, its analgesic properties and ability to prevent the development of morphine tolerance make it an attractive candidate for use in both monotherapy and combination therapy for neuropathic pain. Notably, recent clinical studies have confirmed the efficacy of astaxanthin-containing preparations in reducing pain associated with osteoarthritis and arthritis, further supporting the therapeutic potential of astaxanthin. The observations presented here may serve as a foundation for the development of new therapeutic strategies, which are in line with modern concepts of neuropathic pain management, and could ultimately contribute to the improvement of patients' quality of life.

SPIS PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD DOKTORATU

Prace przeglądowe:

1. **Ciapała K**, Mika J, Rojewska E. *The Kynurenine Pathway as a Potential Target for Neuropathic Pain Therapy Design: From Basic Research to Clinical Perspectives*. Int J Mol Sci. 2021 Oct 13;22(20):11055. doi: 10.3390/ijms222011055.
   IF_{2021}= 6.208; $MNiSW_{2021}$=140

2. **Ciapała K**, Mika J. *Advances in Neuropathic Pain Research: Selected Intracellular Factors as Potential Targets for Multidirectional Analgesics*. Pharmaceuticals (Basel). 2023 Nov 17;16(11):1624. doi: 10.3390/ph16111624.
   IF_{2023}=4.3; $MNiSW_{2023}$=140

Prace oryginalne:

1. **Ciapała K**, Pawlik K, Ciechanowska A, Mika J, Rojewska E. *Effect of pharmacological modulation of the kynurenine pathway on pain-related behavior and opioid analgesia in a mouse model of neuropathic pain*. Toxicol Appl Pharmacol. 2023 Feb 15;461:116382. doi: 10.1016/j.taap.2023.116382.
   IF_{2023}=3.3; $MNiSW_{2023}$=140

2. **Ciapała K**, Rojewska E, Pawlik K, Ciechanowska A, Mika J. *Analgesic Effects of Fisetin, Peimine, Astaxanthin, Artemisinin, Bardoxolone Methyl and 740 Y-P and Their Influence on Opioid Analgesia in a Mouse Model of Neuropathic Pain*. Int J Mol Sci. 2023 May 19;24(10):9000. doi: 10.3390/ijms24109000.
   IF_{2023}= 4.9; $MNiSW_{2023}$=140

3. **Ciapała K**, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J. *Promising effects of astaxanthin on pain-related behaviors and morphine tolerance in a mouse model of neuropathic pain: Possible involvement of Nrf2 and the NMDA receptor subunit NR2B*. Neurotherapeutics. 2025 Oct;22(6):e00765. doi: 10.1016/j.neurot.2025.e00765.
   IF_{2024}= 6.9; $MNiSW_{2024}$=140

4. **Ciapała K**, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J. *Astaxanthin has a beneficial influence on pain-related symptoms and opioid-induced hyperalgesia in mice with diabetic neuropathy-evidence from behavioral studies*. Pharmacol Rep. 2024 Dec;76(6):1346-1362. doi: 10.1007/s43440-024-00671-9.
   IF_{2024}=3.8; $MNiSW_{2024}$=100

Sumaryczny wskaźnik cytowań (impact factor, IF) = 29.408

Sumaryczna liczba punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) = 800

Ryciny przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej zostały wykonane przy użyciu programu BioRender (https://www.biorender.com/, dostęp: 21.01.2025 r.)

1. WSTĘP

1.1. Ból i procesy nocycepcji

Ból jest jednym z najbardziej złożonych i wielowymiarowych doświadczeń biologicznych, które towarzyszą człowiekowi przez całe życie. Od najdawniejszych czasów ludzie starali się zrozumieć naturę bólu, a jego znaczenie i mechanizmy biologiczne były przedmiotem refleksji filozofów i medyków. Z punktu widzenia ewolucji pełni on ważną funkcję ochronną, umożliwiając organizmowi identyfikację oraz unikanie bodźców potencjalnie szkodliwych. Choć doświadczenie bólu jest powszechne i intuicyjnie rozpoznawalne, to jednoznaczne zdefiniowanie tego zjawiska nadal pozostaje zadaniem wyjątkowo trudnym. Zgodnie z aktualną definicją Międzynarodowego Towarzystwa Badania Bólu (ang. *International Association for the Study of Pain*, IASP) ból określany jest jako „*przykre doznanie czuciowe i emocjonalne, związane, lub przypominające doznanie związane z aktualnie występującym lub potencjalnym uszkodzeniem tkanek*”[1]. Sformułowanie to podkreśla zarówno sensoryczny jak i afektywny komponent bólu, wskazując na jego subiektywny charakter, podczas gdy pojęcie nocycepcji, wprowadzone w pierwszej połowie XX wieku przez Sir Charlesa Sherringtona – wybitnego angielskiego neurofizjologa, odnosi się do neuronalnego kodowania potencjalnego lub rzeczywistego uszkodzenia tkanek[2,3]. Chociaż stymulacja nocyceptywna zwykle prowadzi do odczucia bólu, badania farmakologiczne oraz obserwacje pacjentów po uszkodzeniach mózgu wykazują, że zjawiska te mogą występować niezależnie od siebie[3,4]. Detekcja bodźców czuciowych ma charakter wielowymiarowy, ponieważ obejmuje nie tylko doznania bólowe, lecz również percepcję temperatury, dotyku oraz informacji proprioceptywnych związanych z położeniem i ruchem stawów. Podstawą odczuwania bólu u człowieka jest aktywność złożonej, rozproszonej sieci połączeń neuronalnych obejmującej struktury obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego[5]. Proces powstawania i przetwarzania bodźców bólowych obejmuje cztery zasadnicze etapy: transdukcję, przewodzenie, modulację oraz percepcję[6]. W modelach uproszczonych przedstawia się je jako liniowy ciąg połączeń neuronalnych, jednak w rzeczywistości system ten charakteryzuje się dużym stopniem rozproszenia i wzajemnych interakcji.

Transdukcja polega na konwersji energii bodźców potencjalnie uszkadzających — mechanicznych, termicznych lub chemicznych — w impulsy elektryczne. Proces ten zachodzi na poziomie nocyceptorów zlokalizowanych w pierwotnych zakończeniach nerwowych włókien Aδ oraz C, które przekazują informację z mięśni, narządów trzewnych oraz skóry. Włókna nerwowe typu Aδ charakteryzują się niewielką średnicą oraz obecnością osłonki

mielinowej, co umożliwia szybkie przewodzenie impulsów nerwowych, natomiast włókna typu C są najcieńsze i pozbawione mieliny, co czyni je najwolniej przewodzącymi[7,8]. Ich projekcje kierują się przede wszystkim do blaszek I i II ale także V rogu tylnego rdzenia kręgowego. Zarówno włókna Aδ jak i C są odpowiedzialne za przewodzenie informacji wywołanych przez bodźce o charakterze mechanicznym, termicznym lub chemicznym[9].

Powstały impuls nerwowy dociera następnie do zwojów korzeni grzbietowych, gdzie inicjuje uwalnianie neuroprzekaźników, w szczególności glutaminianu, substancji P oraz peptydu związanego z genem kalcytoniny (CGRP) w obrębie synaps tworzonych przez aferentne włókna czuciowe w rogach tylnych rdzenia kręgowego[10]. Stamtąd informacja nocyceptywna przekazywana jest do wyższych pięter ośrodkowego układu nerwowego a etap ten określany jest jako **przewodzenie** bodźca bólowego. Proces ten przebiega poprzez cztery główne drogi wstępujące. Drogi rdzeniowo-wzgórzowe boczna i przyśrodkowa odpowiadają za komponentę sensoryczno-dyskryminacyjną bólu, umożliwiając lokalizację oraz ocenę intensywności bodźca; droga rdzeniowo-siatkowata uczestniczy w kształtowaniu reakcji autonomicznych i emocjonalnych, natomiast droga rdzeniowo-śródmózgowiowa odgrywa istotną rolę w modulacji i hamowaniu doznań bólowych[6]. Poza tymi tradycyjnie wyodrębnianymi drogami sygnały z rdzenia docierają również do licznych struktur pośrednich, tworząc rozległą sieć kolateralnych połączeń neuronalnych[5]. Przykładowo, w literaturze opisuje się projekcje związane z przewodzeniem bodźców bólowych pomiędzy rdzeniem kręgowym a istotą szarą okołowodociągową, jądrem półleżącym górnym, jądrem środkowym ciała migdałowatego czy podwzgórzem[5].

Podczas transmisji sygnału nocyceptywnego dochodzi do jego dynamicznej regulacji, obejmującej zarówno mechanizmy torowania, jak i hamowania, co określa się mianem **modulacji**. Zachodzi ona na różnych poziomach układu nerwowego — od rogów tylnych rdzenia kręgowego, poprzez drogi wstępujące, aż po struktury mózgowia. Jedną z kluczowych ról w zstępującym układzie hamującym odgrywa istota szara okołowodociągowa, która otrzymuje sygnały z licznych struktur mózgu, takich jak podwzgórze, ciało migdałowate czy kora mózgowa. Hamowanie zstępujące zachodzi przede wszystkim dzięki udziałowi endogennych peptydów opioidowych, a także przekaźników, takich jak serotonina, noradrenalina, kwas ɣ-aminomasłowy (ang. *ɣ-aminobutyric acid*, GABA) oraz adenozyna[10].

Ostatni etap, czyli **percepcja**, zachodzi w wyspecjalizowanych obszarach kory mózgowej i odpowiada za świadome odczuwanie bólu, jego interpretację poznawczą oraz kształtowanie indywidualnej reakcji emocjonalnej. Intensywność i lokalizacja bólu przetwarzane są głównie w obszarach S1 i S2 kory somatosensorycznej, natomiast wymiar emocjonalny wiąże się z aktywnością kory zakrętu obręczy[11].

Warto podkreślić, że system przekaźnictwa bólowego charakteryzuje się rozproszeniem kierunkowości przetwarzania informacji, a sygnały nocyceptywne mogą być przesyłane również antydromowo, do unerwianych tkanek. Pobudzenie włókien nocyceptywnych aktywuje zarówno mechanizmy przewodzenia wstępującego, jak i zstępującego, uczestnicząc w modulacji bólu. Wśród efektów działania zstępującego układu hamującego wyróżnia się różne formy analgezji, jak hamowanie bólu przez bodziec nocyceptywny, analgezję indukowaną stresem (ang. *stress-induced analgesia*) oraz analgezję wywołaną przez placebo, której działanie związane jest m.in. z aktywacją ośrodkowych szlaków opioidowych[12].

Ból jest zjawiskiem niejednorodnym i może być klasyfikowany według różnych kryteriów, takich jak czas trwania, mechanizm powstawania oraz obraz kliniczny. Wyróżnia się ból ostry, pełniący funkcję ostrzegawczą, oraz ból przewlekły, który utrzymuje się lub nawraca przez okres dłuższy niż typowy czas gojenia tkanek, najczęściej przyjmowany umownie jako czas przekraczający 3 miesiące[6]. Ze względu na mechanizmy patofizjologiczne rozróżnia się ból nocyceptywny, będący efektem pobudzenia receptorów bólowych w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek, ból neuropatyczny wynikający z choroby lub uszkodzenia układu nerwowego oraz ból nocyplastyczny, związany z zaburzeniami przetwarzania informacji bólowej[13]. Dodatkowo, w zależności od umiejscowienia źródła bodźca, ból nazywa się somatycznym, gdy pochodzi z tkanek powierzchownych (skóra, tkanki podskórne) lub głębokich (mięśnie, stawy, kości) a także trzewnym, gdy pochodzi z narządów wewnętrznych jamy brzusznej. W praktyce klinicznej poszczególne typy bólu często występują razem, tworząc złożone zespoły bólowe o mieszanym mechanizmie powstawania.

1.2. Ból neuropatyczny - charakterystyka

Ból, szczególnie w postaci przewlekłej, zwykle traci swój charakter adaptacyjny i staje się samodzielnym problemem klinicznym, istotnie obniżającym jakość życia pacjentów oraz generującym znaczne koszty społeczne i ekonomiczne[14]. Jednym z jego rodzajów jest ból neuropatyczny, stanowiący jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej neurobiologii i medycyny klinicznej, zarówno ze względu na wysoki odsetek pacjentów nieodpowiadających na standardową farmakoterapię, jak i na jego złożoną, wieloprzyczynową patofizjologię. IASP definiuje go jako „*ból spowodowany uszkodzeniem lub chorobą somatosensorycznego układu nerwowego*”, co prowadzi do szeregu zmian neuroplastycznych na poziomie obwodowym i ośrodkowym[15]. Dane epidemiologiczne wskazują, że ból neuropatyczny dotyczy od 7-10% ludzi na świecie[16] i w praktyce klinicznej charakteryzuje się on wysokim zróżnicowaniem objawów. Pacjenci opisują go często jako palący, kłujący, przeszywający lub przypominający porażenie prądem, zgłaszają także zaburzenia czucia, a nawet jego utratę. Charakterystyczne

jest również występowanie objawów takich jak **allodynia** czyli ból wywołany bodźcem niebólowym oraz **hiperalgezja**, będąca nadmierną odpowiedzią na bodziec bólowy, które dotyczą od 15 do 50% osób cierpiących z powodu neuropatii[17]. Etiologia bólu neuropatycznego jest złożona, gdyż uszkodzenie struktur nerwowych może być następstwem nie tylko urazu mechanicznego, lecz również chorób nowotworowych lub chemioterapii, schorzeń demielinizacyjnych, działania toksyn, zaburzeń metabolicznych, a także zakażeń wirusowych[15]. Klasycznym przykładem mononeuropatii, czyli uszkodzenia pojedynczego nerwu, są neuropatie pourazowe i pooperacyjne[18]. W badaniach podstawowych tego rodzaju zaburzenia odzwierciedla m.in. model podwiązania nerwu kulszowego, który został wykorzystany również w eksperymentach prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej. Polineuropatie, będące rozlanym i symetrycznym uszkodzeniem wielu włókien nerwowych najczęściej mają podłoże metaboliczne a ich najczęstszą przyczyną na świecie jest cukrzyca, choroba określana mianem epidemii XXI wieku[19,20]. Przewlekła hiperglikemia prowadzi do gromadzenia się sorbitolu w komórkach nerwowych, co nasila stres oksydacyjny i w konsekwencji prowadzi do ich uszkodzenia[21]. Podobne mechanizmy obserwuje się w zwierzęcym modelu neuropatii cukrzycowej indukowanej podaniem streptozotocyny, który został również zastosowany w badaniach stanowiących podstawę niniejszej pracy doktorskiej.

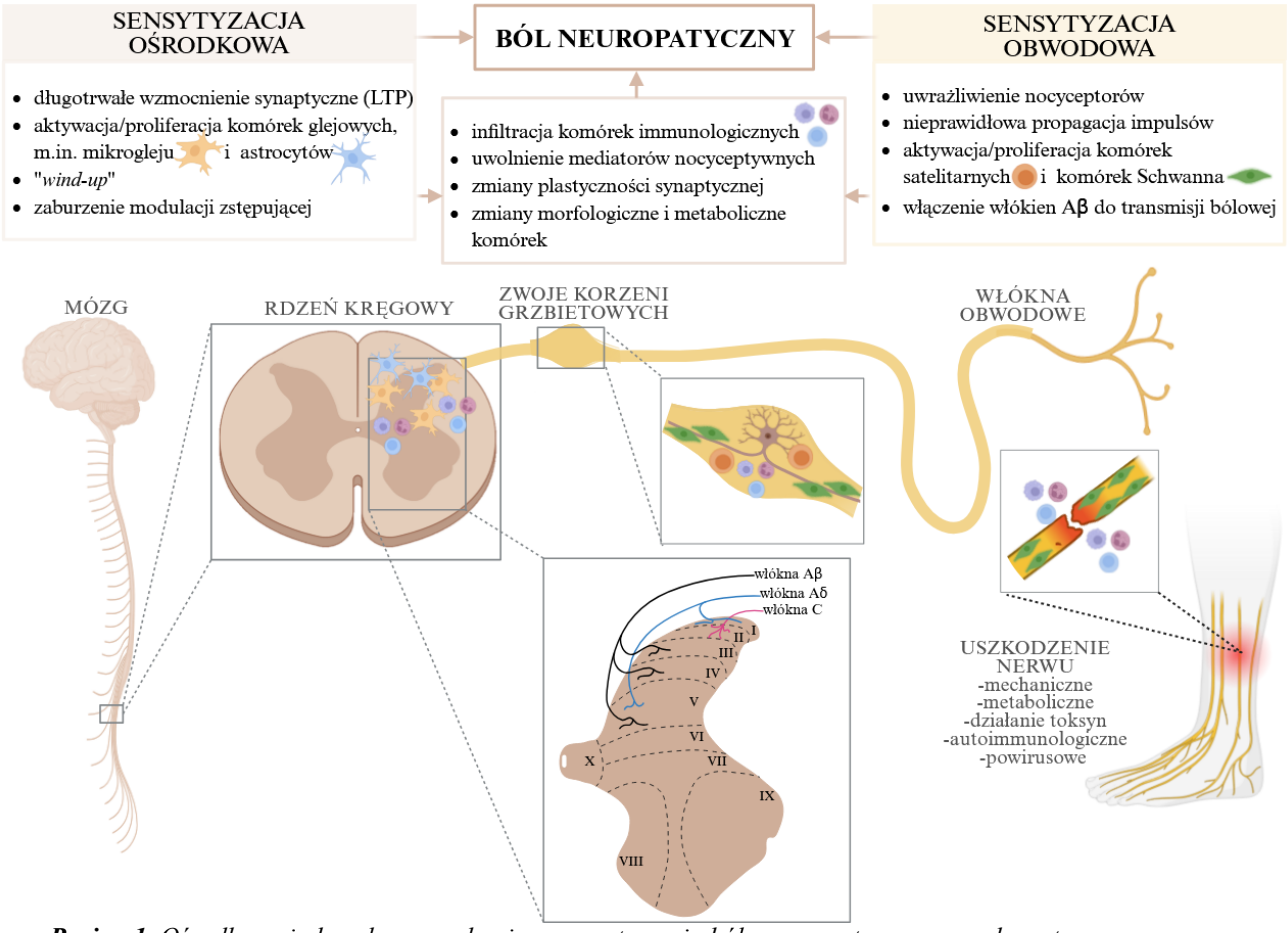
W najnowszej literaturze podkreśla się istnienie różnic między kobietami a mężczyznami w zakresie częstości występowania, charakterystyki oraz przebiegu bólu neuropatycznego, jednak przyczyny tej odmienności nadal pozostają słabo poznane. Zagadnienie to ma szczególne znaczenie w kontekście farmakoterapeutycznym, ponieważ coraz częściej wskazuje się na istnienie różnic międzypłciowych w skuteczności oraz bezpieczeństwie stosowanych leków[22].

1.3. Ból neuropatyczny – mechanizm powstawania

Mechanizmy patofizjologiczne leżące u podstaw rozwoju bólu neuropatycznego nie zostały dotychczas w pełni wyjaśnione[10,15,23]. Jest on efektem wielu maladaptacyjnych i zróżnicowanych zmian zarówno na poziomie obwodowego, jak i ośrodkowego układu nerwowego[6] (**Rycina 1**). Uszkodzenie nerwu prowadzi do uwolnienia wielu mediatorów o właściwościach nocyceptywnych, takich jak tlenek azotu, cytokiny, bradykinina lub serotonina, a w konsekwencji także do napływu komórek układu immunologicznego. Obserwuje się również aktywację i proliferację komórek satelitarnych, które otaczają ciała neuronów w zwojach korzeni grzbietowych i uczestniczą w modulacji ich funkcji. Wszystko to powoduje nasilenie reakcji zapalnej, następują zmiany w ekspresji kanałów jonowych, zwłaszcza sodowych, wapniowych i potasowych, co sprzyja spontanicznej aktywności

uszkodzonych aksonów i powstawaniu patologicznych wyładowań ektopowych. Wiąże się to również z zaburzeniami w transporcie i składzie czynników troficznych docierających do ciał neuronów w zwojach korzeni grzbietowych, co skutkuje istotnymi zmianami morfologicznymi i metabolicznymi tych komórek. Jednocześnie procesom tym towarzyszy nieprawidłowa regeneracja nerwu, dochodzi do proliferacji komórek Schwanna oraz prób regeneracji włókien nerwowych, które jednak często mają charakter chaotyczny i niekontrolowany. W rezultacie generowana jest seria nieprawidłowych impulsów, niezależna od bodźców zewnętrznych, a wszystko to składa się na rozwój **obwodowej sensytyzacji**[6,23].

Dochodzi także do zmian strukturalnych w rogach tylnych rdzenia kręgowego. Pomiędzy neuronami warstw II - V powstają nieprawidłowe połączenia synaptyczne, a do transmisji bodźca bólowego włączone zostają włókna Aβ, które w warunkach normalnych przewodzą niebólowe bodźce dotykowe, zatem sygnał wejściowy o bodźcu mechanicznym odbierany jest jako bólowy. Co więcej, powstają również rozgałęzienia włókien współczulnych, które oplatają zwoje korzeni grzbietowych, prowadząc do zaburzonej interakcji pomiędzy somatycznym i autonomicznym układem nerwowym. W efekcie, bodźce fizjologiczne, które wywołują odpowiedź układu współczulnego mogą przyczyniać się do powstawania dolegliwości bólowych[10].



***Rycina 1**. Ośrodkowe i obwodowe mechanizmy powstawania bólu neuropatycznego – schemat opracowany na podstawie literatury* [6,8,23,24].

Na poziomie rdzenia kręgowego i mózgu rozwija się również zjawisko **ośrodkowej sensytyzacji**, polegające na wzroście pobudliwości neuronów rogów tylnych. Proces ten jest związany z nasilonym uwalnianiem glutaminianu i neuropeptydów, takich jak substancja P czy CGRP oraz aktywacją receptorów N-metylo-D-asparaginowych (NMDA) i neurokininowych. Aktywacja receptorów NMDA prowadzi do zwiększonego napływu jonów wapniowych do komórki, zmian w ekspresji genów oraz utrwalenia patologicznych wzorców pobudzenia. Charakterystycznym przejawem sensytyzacji ośrodkowej jest zjawisko „samonapędzania się" (ang. „*wind-up*") będące narastającą odpowiedzią neuronów na powtarzające się bodźce o niewielkiej intensywności, co powoduje rozszerzenie pól receptorowych i zwiększenie aktywności spoczynkowej neuronów nocyceptywnych. W konsekwencji dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy hamowaniem a torowaniem informacji bólowej, przy czym osłabieniu ulegają szlaki odpowiedzialne za tłumienie bólu, natomiast nasileniu ulegają mechanizmy sprzyjające jego odczuwaniu. W rezultacie ból ulega utrwaleniu i staje się trudny do skutecznego leczenia farmakologicznego[24].

Tradycyjnie uważano, że mechanizmy neuronalne dominują w powstawaniu i utrzymywaniu się bólu neuropatycznego, jednak stosunkowo niedawno udowodniono, że bardzo istotną rolę w tych procesach odgrywają również komórki glejowe, w szczególności mikroglej i astrocyty[25–28]. Wykazano, że uszkodzenie nerwu obwodowego wiąże się ze wzrostem ekspresji markerów aktywacji komórek glejowych w grzbietowej części rdzenia kręgowego: domeny wiążącej wapń 1 (ang. *ionized calcium-binding adapter molecule*, IBA-1), wskazującego na aktywację/infiltrację/proliferację mikrogleju i/lub makrofagów oraz kwaśnego białka włókienkowego (ang. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) charakterystycznego dla aktywowanych astrocytów[29–34]. **Mikroglej**, będący wyspecjalizowaną populacją rezydentnych makrofagów ośrodkowego układu nerwowego, pełni podstawowe funkcje immunologiczne i homeostatyczne. W warunkach fizjologicznych wykazuje fenotyp określany jako spoczynkowy, podczas gdy w sytuacji uszkodzenia nerwów obwodowych, niedokrwienia, infekcji lub działania czynników toksycznych mikroglej ulega aktywacji i przechodzi w stan reaktywny, cechujący się zwiększoną proliferacją, zmianą morfologii oraz podwyższoną ekspresją wielu mediatorów prozapalnych, takich jak interleukina 1β (IL-1β), lub czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor alfa;* TNF-α), liczne chemokiny (CCL1/2/3/5/7/8/9/11, CXCL3/9/10/12/13/14/17; XCL1, CX3CL1)[35–46] oraz czynniki wzrostu. Mediatory te oddziałują na neurony rogów tylnych rdzenia kręgowego, prowadząc do zmian w transmisji synaptycznej i pobudliwości neuronów[47–50]. **Astrocyty,** będące najliczniejszą grupą komórek układu nerwowego, również ulegają aktywacji po uszkodzeniu nerwu, co także wiąże się zmianami w ekspresji białek strukturalnych

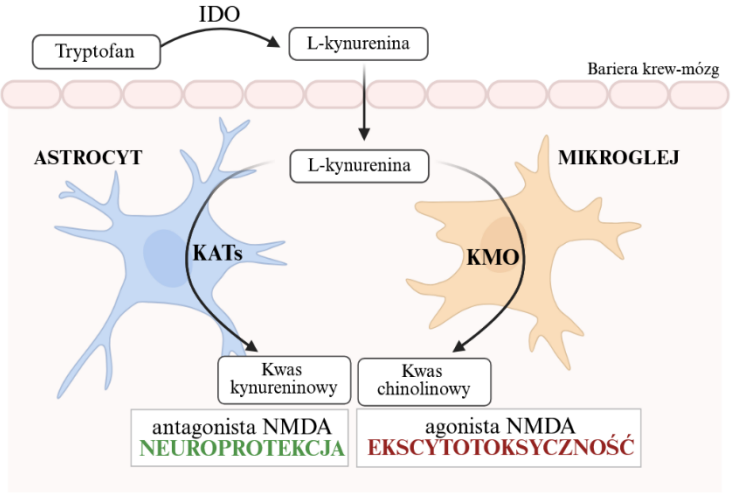
i receptorowych oraz zwiększoną produkcją mediatorów zapalnych[26,51]. Często aktywacja ta prowadzi do astrogliozy, zwanej także reaktywną astrocytozą, czyli nadmiernej proliferacji astrocytów. Proces ten ma podwójny charakter – z jednej strony może przyczyniać się do śmierci neuronów i oligodendrocytów, z drugiej natomiast wspiera odbudowę bariery krew-mózg, ogranicza infiltrację leukocytów z obwodu oraz zapewnia wsparcie metaboliczne dla uszkodzonych neuronów[52,53]. Warto zaznaczyć, że mikroglej i astrocyty, choć zwyczajowo dzielone dychotomicznie na komórki neurotoksyczne, o charakterze prozapalnym (M1/A1) oraz neuroprotekcyjne, które wspierają procesy regeneracyjne (M2/A2), w rzeczywistości funkcjonują w znacznie bardziej złożony i elastyczny sposób[54–56]. Współczesne badania wskazują, że w odpowiedzi na uraz lub stres oksydacyjny komórki te nie przyjmują jednego ustalonego fenotypu, lecz adaptują swoje funkcje do potrzeb tkanki, przechodząc przez szereg dynamicznych przemian funkcjonalnych, które kształtują się w czasie i zależą od wielu czynników.

1.4.Rola szlaku kynureninowego w bólu neuropatycznym

Zaburzeniom funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego często towarzyszą zmiany w metabolizmie tryptofanu, który jest prekursorem do syntezy różnych aktywnych biologicznie cząsteczek, takich jak: dinukleotyd nikotynamidoadeninowy, kwas nikotynowy lub serotonina[57,58]. Główną ścieżką przemian tego aminokwasu jest szlak kynureninowy, a powstające w jego przebiegu metabolity, nazywane kynureninami, wykazują szerokie spektrum działania — od modulowania pobudliwości neuronów po regulację odpowiedzi komórek układu immunologicznego[59–61]. Pierwszy etap szlaku stanowi przekształcenie tryptofanu w N-formylo-L-kynureninę, a jednym z enzymów odpowiedzialnych za tą przemianę jest 2,3-dioksygenaza indoloaminowa (ang. *indoleamine 2,3-dioxygenase*, IDO) 1 i 2. Wśród kynurenin to **kwas kynureninowy** oraz **kwas chinolinowy** zyskały w ostatnich latach szczególną uwagę naukowców, ponieważ cechują je przeciwstawne właściwości. Kwas chinolinowy, znany również jako kwas pirydyno 2,3-dikarboksylowy, jest specyficznym agonistą receptora NMDA, a konkretnie podgrup zawierających podjednostki NR2A i NR2B, przez co wykazuje potencjał neurotoksyczny[62]. Potwierdzają to wyniki badań, w których podanie antagonisty NMDA (MK-801) całkowicie likwiduje peroksydację lipidów wywołaną przez kwas chinolinowy[63]. Natomiast kwas kynureninowy, będący jednym z najlepiej poznanych metabolitów szlaku, jest nieselektywnym antagonistą receptorów NMDA i kainowych, a także receptora kwasu α-amino-2,3-dihydro-5-metylo-3-okso-isoksazolopropionowego (ang. *alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid;* AMPA)[64], przy czym najsilniejsze działanie hamujące w transmisji glutaminergicznej wynika

z blokowania strychninoniezależnej glicynowej części kompleksu receptora NMDA[65]. Wykazano, że kwas kynureninowy ma działanie przeciwdrgawkowe i neuroprotekcyjne, stąd zmiany w jego poziomie mogą mieć znaczenie w niektórych schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego, zwłaszcza tych, które są ściśle związane z ekscytotoksycznością[66–68]. Głównym metabolitem szlaku kynureninowego jest **L-kynurenina**, której zwiększone stężenie we krwi i układzie nerwowym odzwierciedla wzmożony metabolizm tryptofanu, dlatego jest wykorzystywana jako biomarker w wielu chorobach neurologicznych. Wykazano, że ma ona działanie zarówno pro-, jak i antyutleniające[69–72], oraz że może działać jako endogenny ligand receptora węglowodorów aromatycznych (ang. *aryl hydrocarbon receptor,* AhR)[73]. Niedawno wysunięto również hipotezę, że oś L-kynurenina - AhR może pełnić rolę w neurodegeneracji i uszkodzeniu mózgu[67,74,75].

Przeciwstawne właściwości kwasu kynureninowego oraz kwasu chinolinowego sprawiły, że w literaturze zaczęto tradycyjnie dzielić szlak kynureninowy na gałąź neuroprotekcyjną oraz neurotoksyczną (**Rycina 2**). Co szczególnie istotne w kontekście patogenezy bólu neuropatycznego, gałęzie wydają się być od siebie przestrzennie oddzielone. Za syntezę kwasu chinolinowego w układzie nerwowym odpowiadają głównie mikroglej i makrofagi, dzięki obecności enzymu **3-monooksygenazy kynureninowej** (ang. *kynurenine 3-monooxygenase*, KMO), natomiast astrocyty są wyposażone w **aminotransferazy kynureninowe** (ang. *kynurenine aminotransferases,* KATs) umożliwiające produkcję kwasu kynureninowego[76].



***Rycina 2**. Przebieg szlaku kynureninowego, z podziałem na gałąź neuroprotekcyjną oraz neurotoksyczną – schemat na podstawie literatury*[58–60,76].

Pomimo rosnącego zainteresowania szlakiem kynureninowym, jego rola w procesach nocycepcji pozostaje nadal słabo poznana i wymaga dalszych badań. Dotychczas wykazano, że kynureniny pełnią istotną rolę w patofizjologii migreny, a także w bólu zapalnym[77,78]. Ponadto, wcześniejsze badania prowadzone w Zakładzie Farmakologii Bólu IF PAN pozwoliły wysnuć hipotezę, że w bólu neuropatycznym dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy neurotoksycznymi a neuroprotekcyjnymi metabolitami szlaku kinureninowego, które współwystępuje ze zmianami w aktywności komórek glejowych[33,46,79]. W konsekwencji, selektywne

hamowanie aktywności wybranych enzymów tego szlaku mogłoby stanowić potencjalną strategię łagodzenia bólu neuropatycznego.

Przebieg szlaku kinureninowego, a także jego rola w patogenezie bólu neuropatycznego zostały szczegółowo omówione w publikacji przeglądowej **Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci,* 2021**[80], jednej z prac stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej.

1.5. Rola wybranych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych w bólu neuropatycznym

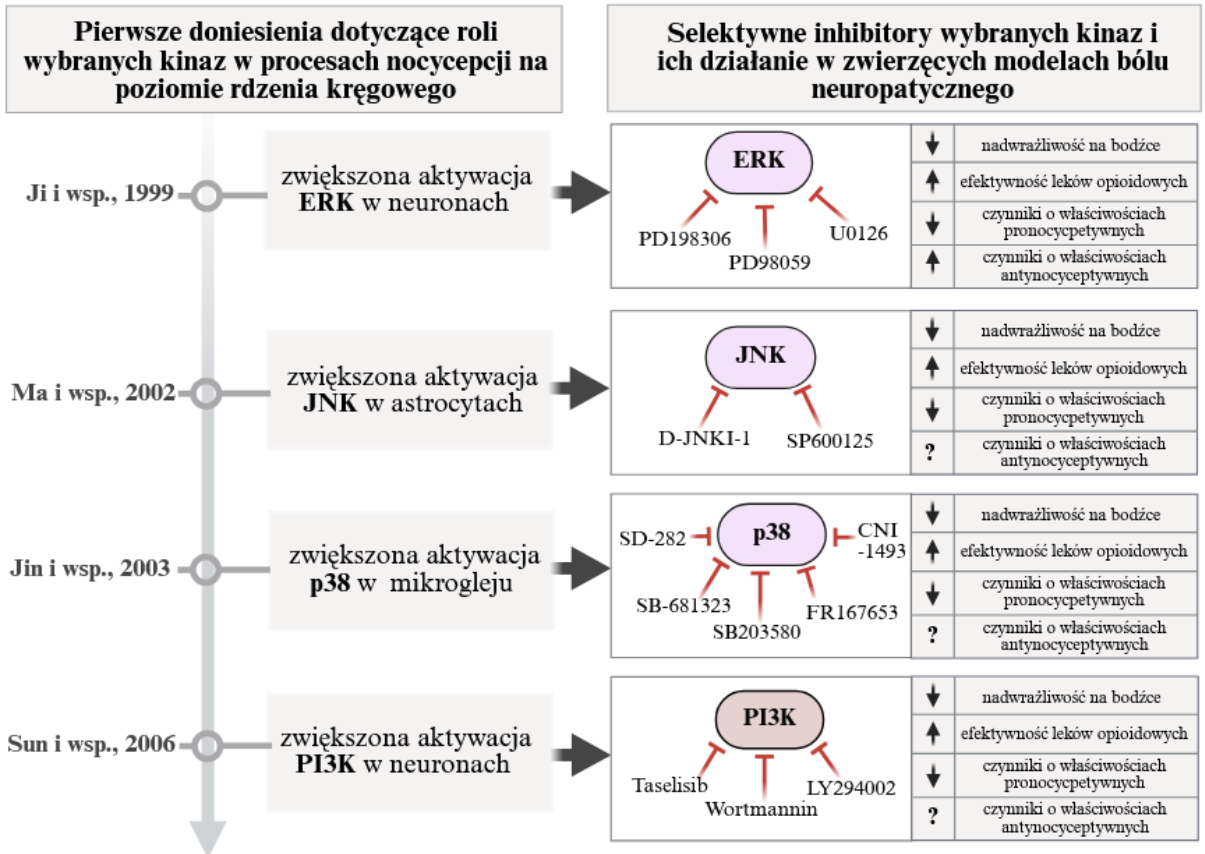
Rozwojowi neuropatii towarzyszą zmiany w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego, obejmujące również aktywację licznych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych[81–83] (**Rycina 3**). Jedną z najważniejszych kaskad modulujących odpowiedź nocyceptywną jest rodzina **kinaz białkowych aktywowanych mitogenami** (ang. *mitogen-activated protein kinases,* MAPKs)[84,85]. Ta ewolucyjnie konserwatywna grupa obejmuje kinazę p38 oraz kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK) i kinazę N-końcową c-Jun (ang. *c-Jun N-terminal kinase*, JNK). Liczne bodźce zewnątrzkomórkowe indukują fosforylację MAPK, co prowadzi do różnorodnych odpowiedzi transkrypcyjnych i post-translacyjnych w komórce[86]. MAPK charakteryzują się hierarchiczną organizacją, co oznacza, że są fosforylowane i aktywowane przez MAPKK, te zaś podlegają fosforylacji i regulacji ze strony MAPKKK. Zazwyczaj MAPKKK są aktywowane w wyniku interakcji z białkami należącymi do rodziny małych białek GTP-azowych, takimi jak Ras/Rap czy RhoA[87].

ERK uczestniczą w licznych procesach regulacji komórkowej. Już w 1999 roku wykazano ich istotną rolę w transmisji nocyceptywnej[88–92] (**Rycina 3**). Po uszkodzeniu nerwu obwodowego lub rdzenia kręgowego dochodzi do aktywacji ERK1/2 zarówno w neuronach, jak i w komórkach glejowych. Prowadzi to do uwalniania licznych czynników pronocyceptywnych, a w konsekwencji do rozwoju nadwrażliwości bólowej[93–96]. Dotychczas wykazano, że podanie podpajęczynówkowe selektywnych inhibitorów sygnalizacji ERK, takich jak U0126, PD198306, oraz PD98059 zmniejsza objawy bólu neuropatycznego w modelach zwierzęcych[93–95,97–99].

Białko **p38** występuje w postaci czterech izoform, w różnych typach komórek. Badania przeprowadzone w modelach zwierzęcych wykazały, że po uszkodzeniu nerwu dochodzi do aktywacji p38 w mikrogleju w rdzeniu kręgowym, czego nie obserwowano w neuronach ani astrocytach[94,100–102]. Od 2003 roku udział p38 w rozwoju bólu neuropatycznego jest już dość dobrze udokumentowany, a dostępne dane literaturowe wskazują również na jej istotny wpływ na skuteczność terapii opioidowej[96,99–104]. Badania podstawowe potwierdziły, że podanie drogą

podpajęczynówkową selektywnych inhibitorów p38, takich jak skepinone-L, SB203580, FR167653, SD-282 czy CNI-1493, ogranicza rozwój bólu neuropatycznego[100,102,104–109]. Ponadto dowiedziono, że FR167653 wpływa na działanie przeciwbólowe morfiny u myszy w modelu neuropatii cukrzycowej[110], natomiast SB203580 opóźnia rozwój tolerancji na morfinę u szczurów[111]. Co niezwykle istotne, przeprowadzono również pierwsze badania kliniczne mające na celu ocenę działania analgetycznego selektywnych inhibitorów p38, takich jak dilmapimod (SB-681323) oraz losmapimod (GW856553), u pacjentów z bólem neuropatycznym[112,113]. Warto podkreślić, że choć początkowo zakładano, iż aktywacja p38 w mikrogleju przebiega w podobny sposób u obu płci, to najnowsze badania pokazują, że skepinone-L wykazuje efekty przeciwbólowe jedynie u samców[105].

W odróżnieniu do p38 i ERK, wiedza na temat udziału **JNK** w procesach nocycepcji jest znacznie bardziej ograniczona. Początkowo, w 2002 roku wykazano, że po uszkodzeniu nerwu obwodowego dochodzi do aktywacji JNK w neuronach czuciowych w zwojach korzeni grzbietowych, jednak ma to miejsce we wczesnej fazie neuropatii[114]. Długotrwałą aktywację JNK obserwowano natomiast na poziomie rdzenia kręgowego, w astrocytach[85,115,116]. Wydaje się zatem, że aktywacja JNK w zwojach korzeni grzbietowych oraz w rdzeniu



***Rycina 3**. Wybrane kinazy wewnątrzkomórkowe w procesach nocycepcji. W kolejnych badaniach wykazano również, że selektywne inhibitory zarówno kinaz MAP[93–95,97–100,102,104–111,114,117,118] jak i PI3K[121,122,124–127] powodują spadek nadwrażliwości w zwierzęcych modelach bólu, a także wpływają na efektywność leków opioidowych i produkcję czynników nocyceptywnych – schemat własny.*
***Legenda:** ⊤-inhibitor, ↑ - wzrost, ↓ -spadek, ? – brak danych*

kręgowym pełni odmienne funkcje — odpowiednio w inicjacji oraz podtrzymywaniu bólu neuropatycznego. Ponadto, badania w modelach zwierzęcych wykazały, że selektywne inhibitory JNK takie jak SP600125 oraz D-JNKI-1 zmniejszają objawy bólu neuropatycznego[114,117,118].

Poza kinazami MAP wewnątrzkomórkową ścieżką sygnałową ważną w procesach bólowych jest również kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphoinositide 3-kinase,* PI3K), która moduluje proliferację, migrację i śmierć komórek poprzez aktywację swojego docelowego białka czyli kinazy B, znanej jako AKT. W wielu badaniach farmakologicznych wykazano dotychczas, że blokada **PI3K** zmniejsza nadwrażliwość w zwierzęcych modelach bólu[119–127] (**Rycina 3**). Jednakże udokumentowano również, że po uszkodzeniu rdzenia kręgowego aktywacja PI3K chroni przed stresem oksydacyjnym, zapaleniem i śmiercią komórek, natomiast jej zahamowanie zapobiega tworzeniu się blizn glejowych[128]. Wydaje się zatem, że rola szlaku PI3K/AKT w ośrodkowym układzie nerwowym jest złożona i może być dwoista.

Warto podkreślić, że w patomechanizmie neuropatii, poza kinazami MAP i PI3, istotną rolę odgrywają również **czynniki transkrypcyjne**, które modulują ekspresję mediatorów pro- i anty- nocyceptywnych[129,130]. Na szczególną uwagę zasługuje jądrowy czynnik transkrypcyjny κB (ang. *nuclear factor kappa B,* NF-κB), który ulega aktywacji w odpowiedzi na różnorodne bodźce immunologiczne, a odbywa się to za pośrednictwem dwóch odmiennych szlaków: klasycznego i alternatywnego. Dane literaturowe wskazują, że aktywacja **NF-κB** po uszkodzeniu nerwu zachodzi nie tylko w zwojach korzeni grzbietowych, ale także w rdzeniu kręgowym w różnych modelach zwierzęcych bólu neuropatycznego, a jej zablokowanie zmniejsza nadwrażliwość, co związane jest z korzystnym wpływem na poziomy czynników pronocyceptywnych, takich jak IL-6 i indukowalna syntaza tlenku azotu[96,99,131–135].

Najnowsze doniesienia literaturowe podkreślają również potencjalną rolę jądrowego czynnika transkrypcyjnego pochodzenia erytroidalnego typu 2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2,* **Nrf2**) w mechanizmach bólu neuropatycznego, gdzie dochodzi do stresu oksydacyjnego. Czynnik Nrf2 jest bowiem kluczowy w obronie komórkowej przed stresem oksydacyjnym. W warunkach fizjologicznych Nrf2 jest zlokalizowany w cytoplazmie i występuje w postaci kompleksu ze swoim inhibitorem, czyli białkiem Keap1[136]. W odpowiedzi na stres oksydacyjny Nrf2 uwalnia się i translokuje do jądra komórkowego, gdzie oddziałuje na ok. 250 genów zawierających sekwencję regulatorową ARE (ang. *antioxidant response element*), przez co dochodzi do zwiększonej ekspresji enzymów antyoksydacyjnych i cytoprotekcyjnych, takich jak oksygenaza hemowa 1 (ang. *heme oxygenase 1*) lub dysmutaza ponadtlenkowa 1 (ang. *superoxide dismutase* 1)[137]. W zwierzęcych

modelach neuropatii przebadano dotychczas kilka selektywnych modulatorów Nrf2, głównie sulforafan i fumaran dimetylu. Zastosowanie tych substancji powodowało osłabienie nadwrażliwości bólowej u zwierząt, co skorelowano ze zmniejszeniem stresu oksydacyjnego i spadkiem ekspresji cytokin pronocyceptywnych, takich jak IL-1β, CCL2 i TNF-α[138–140]. Dotychczasowe obserwacje potwierdzają, że rozwojowi i utrzymywaniu się objawów bólu neuropatycznego niewątpliwie towarzyszą zmiany w wewnątrzkomórkowych ścieżkach sygnałowych. Ponieważ selektywna modulacja wspomnianych wcześniej czynników takich jak MAPK, PI3K, Nrf2 czy NF-κB przynosi istotne korzyści w łagodzeniu objawów bólu neuropatycznego, pozwoliło nam to wysnuć hipotezę, że związki o wielokierunkowym działaniu, modulujące kilka z tych szlaków jednocześnie, mogą wykazywać jeszcze większą skuteczność terapeutyczną. Takie podejście odzwierciedla sedno politerapii, która poprzez jednoczesne modulowanie wielu kluczowych szlaków patofizjologicznych może skuteczniej przywracać homeostazę i oferować efektywniejsze leczenie objawów bólu neuropatycznego. Powyższe rozważania skłoniły nas do kontynuowania badań w tym obszarze.

Szczegółowa rola wspomnianych szlaków wewnątrzkomórkowych oraz charakterystyka niektórych substancji wykazujących wielokierunkowe mechanizmy działania stały się tematem drugiej pracy przeglądowej **Ciapała i Mika, *Pharmaceuticals*, 2023**[141], wchodzącej w cykl publikacji stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej.

1.6. Terapia bólu ze szczególnym uwzględnieniem bólu neuropatycznego

Ból stanowi jeden z najczęstszych objawów, z powodu których pacjenci zgłaszają się po pomoc medyczną. W odpowiedzi na potrzebę usystematyzowania i poprawy skuteczności jego leczenia, w 1986 roku Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) zaproponowała schemat terapeutyczny nazywany drabiną analgetyczną[142]. Model ten został pierwotnie opracowany z myślą o leczeniu bólu nowotworowego, jednak na przestrzeni lat ulegał licznym modyfikacjom i obecnie znajduje zastosowanie w terapii wielu zespołów bólowych, w tym bólu neuropatycznego, który, ze względu na niezwykle skomplikowane mechanizmy powstawania jest bardzo trudny do skutecznego leczenia[143,144]. Postępowanie zgodne z aktualną wersją drabiny analgetycznej WHO umożliwia stopniowe, zindywidualizowane leczenie bólu, a także sprzyja ograniczeniu działań niepożądanych stosowanych leków. W najnowszym ujęciu postępowanie to obejmuje cztery kolejne stopnie terapeutyczne: **I stopnień**, który dotyczy leczenia bólu łagodnego i opiera się na stosowaniu nieopioidowych leków przeciwbólowych, takich jak niesteroidowe leki przeciwzapalne, z możliwością włączenia koanalgetyków; **II stopień** obejmuje terapię bólu umiarkowanego i zakłada zastosowanie słabych opioidów, w tym hydrokodonu, kodeiny lub tramadolu,

w skojarzeniu z analgetykami nieopioidowymi oraz lekami adjuwantowymi; **III stopień** odnosi się do leczenia bólu o dużym nasileniu i wykorzystuje silne opioidy, takie jak morfina, metadon, fentanyl, oksykodon, buprenorfina, tapentadol, hydromorfon czy oksymorfon, również z możliwością terapii skojarzonej; **IV stopień** natomiast obejmuje metody niefarmakologiczne, do których zalicza się szerokie spektrum interwencji jak np. analgezję zewnątrzoponową oraz podpajęczynówkową, blokady nerwów, procedury neuromodulacyjne jak przezskórna elektrostymulacja nerwów (TENS), procedury ablacyjne (np. krioablacje, mikrofale) ale także akupunkturę. Uzupełnieniem terapii są również działania o charakterze wspomagającym, takie jak rehabilitacja, interwencje psychologiczne, obejmujące terapię poznawczą i behawioralną, a także zmiana stylu życia[6,10,142,145,146].

Chociaż scharakteryzowana powyżej klasyczna drabina analgetyczna jest fundamentem terapii bólu, nie sprawdza się ona w pełni w przypadku bólu neuropatycznego. Aktualne wytyczne zaproponowane przez Międzynarodową Grupę ds. Bólu Neuropatycznego (ang. *Neuropathic Pain Special Interest Group*, NeuPSIG) wskazują, że farmakoterapię tego rodzaju bólu w pierwszym rzucie powinny stanowić leki wiążące się z podjednostką α2δ kanałów wapniowych bramkowanych napięciem, wykazujące działanie przeciwdrgawkowe, jak gabapentyna lub pregabalina, a także trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (ang. *tricyclic antidepressants*, TCA) oraz inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (ang. *serotonin norepinephrine reuptake inhibitors*, SNRI) jak duloksetyna lub wenlafaksyna[145,147–149]. Terapie drugiej linii obejmują leki stosowane miejscowo (np. plastry z lidokainą, preparaty i plastry z kapsaicyną), natomiast tramadol oraz silne opioidy są zarezerwowane jako leczenie trzeciej linii, w przypadkach opornych na standardowe postępowanie[150,151]. W leczeniu bólu neuropatycznego wykorzystuje się także inne grupy leków działających na różne mechanizmy patofizjologiczne. Należą do nich kortykosteroidy, które ograniczają procesy zapalne i obrzęk w obrębie nerwów, antagoniści receptorów NMDA jak np. ketamina, hamująca nadmierną pobudliwość neuronów i powstawanie hiperalgezji, oraz blokery układu współczulnego, takie jak klonidyna, które modulują przewodzenie bólu poprzez układ adrenergiczny. Dodatkowo stosuje się leki zwiększające aktywność GABA, na przykład baklofen, który działa hamująco na neurony rdzeniowe, ograniczając przekazywanie impulsów bólowych i łagodząc objawy neuropatii[145]. Pomimo dostępu do wielu opcji terapeutycznych, leczenie bólu neuropatycznego pozostaje ogromnym wyzwaniem klinicznym. Dane statystyczne wskazują, że jedynie blisko 50% pacjentów cierpiących z powodu tego rodzaju bólu po zastosowaniu dostępnej terapii zgłasza rzeczywistą i satysfakcjonującą ulgę[16]. Ponadto leki wykorzystywane w leczeniu bólu neuropatycznego relatywnie często powodują liczne działania niepożądane ze względu na konieczność stosowania stosunkowo wysokich

dawek[152,153]. Wymienione powyżej ograniczenia jednoznacznie podkreślają potrzebę prowadzenia dalszych badań nad mechanizmami i opracowaniem skuteczniejszych metod leczenia bólu neuropatycznego.

Leki opioidowe stosuje się przede wszystkim w leczeniu bólu nocyceptywnego o umiarkowanym i dużym nasileniu, np. w przypadku bólu nowotworowego lub pooperacyjnego. W terapii bólu neuropatycznego ich skuteczność jest mniejsza i zazwyczaj wymaga stosowania wyższych dawek, często w połączeniu z innymi lekami o działaniu wspomagającym[6,154]. Podawane mogą być różnymi drogami, najczęściej doustnie w postaci tabletek lub kropli, a także przezskórnie, np. w plastrach transdermalnych. W sytuacjach, gdy powyższe drogi podawania są utrudnione bądź niemożliwe, stosuje się drogę domięśniową lub dożylną. W przypadkach nieskuteczności wymienionych metod możliwe jest również podanie opioidów bezpośrednio do przestrzeni zewnątrzoponowej lub podpajęczynówkowej. Silne opioidy zaliczane są do leków trzeciego wyboru w leczeniu bólu neuropatycznego, a ich stosowanie ograniczają liczne działania niepożądane, takie jak nudności, zaparcia oraz rozwój tolerancji[154,155]. Zjawisko tolerancji prowadzi do konieczności stopniowego zwiększania dawek w celu utrzymania efektu przeciwbólowego, a wśród mechanizmów za to odpowiedzialnych wymienia się m.in. desensytyzację i internalizację receptorów opioidowych, zmiany w sygnalizacji receptorów sprzężonych z białkiem G, aktywację szlaku cyklicznego adenozyno 3′,5′-monofosforanu a także kinaz MAPK[32,156]. W niektórych przypadkach długotrwałe stosowanie opioidów może również doprowadzić do rozwoju paradoksalnego nasilenia bólu, a stan ten nazywa się hiperalgezją indukowaną opioidami (ang. *opioid-induced hyperalgesia*, OIH). Jest to zjawisko wieloczynnikowe, związane z dysfunkcyjną modulacją zstępujących dróg hamujących, a odpowiadające za nie mechanizmy częściowo pokrywają się mechanizmami tolerancji opioidowej, co ma znaczenie dla strategii terapeutycznych[157,158].

Morfina, stosowana w różnych postaciach, należy do najstarszych znanych człowiekowi leków przeciwbólowych. Już około 3000 r. p.n.e. uprawiano mak lekarski (*Papaver somniferum*) ze względu na jego właściwości lecznicze, a przełomem było wyizolowanie morfiny z opium w 1804 r. przez Friedricha Sertürnera, co zapoczątkowało rozwój nowoczesnej farmakologii opioidowej i umożliwiło jej szerokie zastosowanie kliniczne[159]. Na bazie naturalnych alkaloidów opioidowych występujących w maku lekarskim opracowano wiele opioidów półsyntetycznych (m.in. oksykodon, buprenorfinę, diamorfinę, nalbufinę), a w XX wieku również syntetyczne opioidy należące do różnych grup chemicznych, takich jak pochodne morfinanu, difenyloheptanu, benzomorfanu i fenylopiperydyny[160]. W latach 80. XX wieku WHO zarekomendowała morfinę jako podstawowy lek w leczeniu silnego bólu nowotworowego, a wprowadzenie preparatów o przedłużonym uwalnianiu umożliwiło

efektywniejsze dawkowanie. Morfina jest agonistą receptora opioidowego μ (MOR), a także, z mniejszym powinowactwem, receptora δ (DOR) i κ (KOR). Większość działania przeciwbólowego morfina wywiera poprzez wiązanie się z MOR zlokalizowanym w układzie nerwowym. Wywołuje ona aktywację zstępujących dróg hamujących oraz zahamowanie aktywności nocyceptywnych neuronów aferentnych, co prowadzi do ogólnego ograniczenia transmisji sygnałów bólowych[161]. Jest podawana różnymi drogami, najczęściej doustnie lub dożylnie, jednak jej niska lipofilność powoduje opóźnione przenikanie przez barierę krew-mózg. Znaczna część dawki doustnej ulega efektowi pierwszego przejścia, a jej aktywne metabolity, zwłaszcza 6-glukuronid morfiny, cechują się długotrwałym i silnym działaniem przeciwbólowym. Stosowanie morfiny wiąże się z licznymi działaniami niepożądanymi, w tym depresją oddechową lub zaburzeniami ze strony przewodu pokarmowego. Co istotne, morfina aktywuje mikroglej, nasilając produkcję cytokin pronocyceptywnych, co może osłabiać jej skuteczność przeciwbólową i sprzyjać rozwojowi tolerancji[32,143,144].

Oksykodon jest półsyntetycznym opioidowym lekiem przeciwbólowym, pochodną tebainy, będącym agonistą MOR oraz w mniejszym stopniu KOR. Działa głównie na poziomie ośrodkowego układu nerwowego, zmniejszając przewodzenie impulsów nocyceptywnych i aktywując zstępujące szlaki hamujące ból. Oksykodon cechuje się dobrą biodostępnością po podaniu doustnym i szybkim początkiem działania, co sprawia, że jest skuteczny zarówno w bólu ostrym, jak i przewlekłym. Podany drogą doustną wywołuje około 2-krotnie silniejszy efekt przeciwbólowy od morfiny. Co ważne, w porównaniu do morfiny oksykodon wykazuje silne działanie analgetyczne przy nieco mniejszym ryzyku depresji oddechowej i w mniejszym stopniu powoduje zaparcia, choć działania niepożądane typowe dla opioidów, takie jak nudności, senność czy możliwość uzależnienia, nadal występują. Lek jest metabolizowany w wątrobie przez enzymy CYP3A4 i CYP2D6, co należy uwzględnić przy politerapii ze względu na wysokie ryzyko interakcji. Oksykodon jest stosowany w terapii bólu nowotworowego, pooperacyjnego oraz neuropatycznego, a formy o przedłużonym uwalnianiu umożliwiają wygodne i stabilne kontrolowanie bólu przewlekłego. Podobnie jak inne opioidy, może prowadzić do rozwoju tolerancji i uzależnienia, dlatego dawkowanie powinno być indywidualnie dostosowane, a terapia monitorowana[162,163].

Buprenorfina jest półsyntetycznym, silnym opioidem o złożonym mechanizmie działania. Jest częściowym agonistą MOR oraz antagonistą DOR i KOR, a także agonistą receptora nocyceptynowego, o słabym powinowactwie. W porównaniu z morfiną wykazuje około 30-krotnie większą siłę działania i dwukrotnie dłuższy efekt, co wynika z powolnej dysocjacji od MOR, umożliwiając rzadsze dawkowanie w terapii bólu przewlekłego. Pomimo częściowego agonizmu MOR, w dawkach terapeutycznych buprenorfina działa jak

pełny agonista pod względem efektu przeciwbólowego, natomiast efekt pułapowy występuje w odniesieniu do depresji ośrodka oddechowego, co zmniejsza ryzyko depresji oddechowej[144]. Badania wskazują również, że buprenorfina wykazuje działanie przeciwdepresyjne i przeciwlękowe, a jej wpływ na NOR jest istotny w modulacji nocycepcji oraz ograniczeniu rozwoju tolerancji i uzależnienia. Mechanizm analgetyczny buprenorfiny na poziomie rdzenia kręgowego opiera się głównie na MOR i DOR, natomiast w wyższych strukturach układu nerwowego działa częściowo niezależnie od systemu opioidowego, co wiąże się z minimalnym wpływem na funkcje poznawcze, układ nagrody i ograniczeniem neurotoksyczności. Ze względu na silną lipofilność, długi okres półtrwania i niewielkie ryzyko tolerancji, buprenorfinę można podawać domięśniowo, podskórnie, podjęzykowo lub w formie transdermalnej, co pozwala obejść efekt pierwszego przejścia i problemy z biodostępnością po podaniu doustnym. Dodatkowo właściwości farmakodynamiczne buprenorfiny pozwalają na stosowanie jej w terapii substytucyjnej u osób uzależnionych od opioidów, zmniejszając objawy odstawienia i umożliwiając rzadsze dawkowanie. W porównaniu z klasycznymi agonistami MOR, wykazuje ona mniejsze ryzyko zaparć, działania euforyzującego i depresji ośrodka oddechowego, co czyni ją korzystnym wyborem w leczeniu bólu przewlekłego, w tym neuropatycznego[164].

Dane z badań podstawowych i klinicznych wskazują, że największą szansę na skuteczne leczenie bólu neuropatycznego daje politerapia[165–168]. Łączenie preparatów o różnych mechanizmach działania poprawia skuteczność terapii, a jednocześnie pozwala stosować niższe dawki, zmniejszając częstość i nasilenie działań niepożądanych oraz ryzyko konieczności rezygnacji pacjentów z leczenia. Na przykład, połączenie pregabalina/gabapentyny z TCA, SNRI lub niskimi dawkami leków opioidowych jest skuteczniejsze niż monoterapia[169]. Wyniki te uzasadniają stosowanie terapii skojarzonej szczególnie u pacjentów źle tolerujących wysokie dawki pojedynczych leków. Mimo licznych dostępnych opcji terapeutycznych ból neuropatyczny wciąż jest jednym z najtrudniejszych do leczenia, co podkreśla potrzebę poszukiwania nowych punktów uchwytu oraz analgetyków o szerokim spektrum działania, co stało się przedmiotem moich badań.

2. CEL BADAŃ

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie znaczenia farmakologicznej modulacji szlaku kynureninowego oraz wybranych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych na procesy nocycepcji oraz efekty przeciwbólowe leków opioidowych u myszy w modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego i/lub w modelu neuropatii cukrzycowej.

CELE SZCZEGÓŁOWE

1. Określenie znaczenia szlaku kynureninowego w neuropatii poprzez zbadanie wpływu:

a) podania L-kynureniny, jego centralnego metabolitu, na nadwrażliwość na bodźce dotykowe i termiczne oraz efekty przeciwbólowe leków opioidowych,

b) hamowania wybranych enzymów na nadwrażliwość na bodźce dotykowe i termiczne oraz na skuteczność analgetyczną leków opioidowych,

c) inhibitora KMO na działanie przeciwbólowe L-kynureniny,

d) hamowania aktywacji/napływu/proliferacji mikrogleju i makrofagów na efekty analgetyczne L-kynureniny.

2. Zbadanie roli wybranych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych w neuropatii, poprzez analizę:

a) potencjału analgetycznego substancji będących ich modulatorami,

b) wpływu ich modulacji na efekty przeciwbólowe leków opioidowych,

c) skuteczności przeciwbólowej astaksantyny u samców i samic oraz jej wpływu na rozwój tolerancji morfinowej.

3. Identyfikacja potencjalnych punktów uchwytu astaksantyny w neuropatii poprzez określenie:

a) roli wybranych kinaz oraz czynników transkrypcyjnych w mechanizmie jej działania przeciwbólowego,

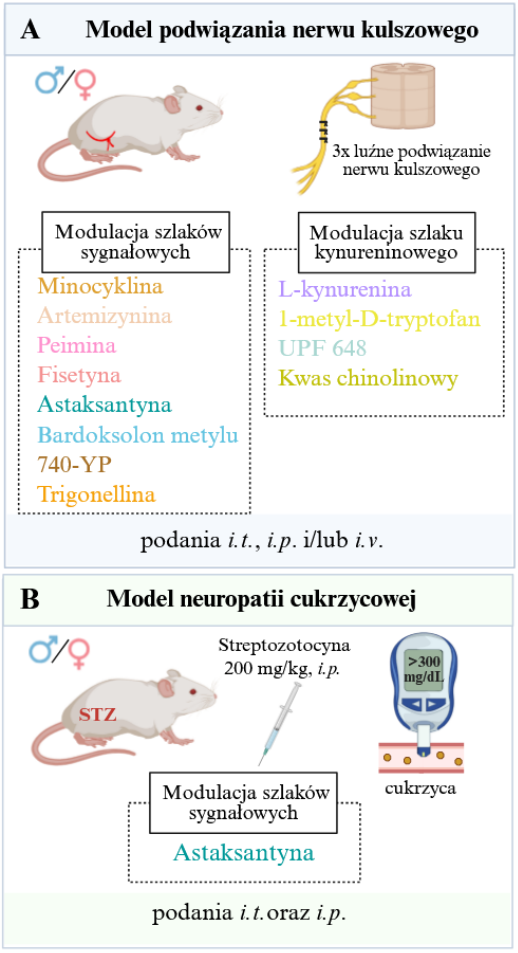
b) jej skuteczności przeciwbólowej po podaniu z kwasem chinolinowym — końcowym metabolitem szlaku kynureninowego oraz agonistą podjednostek NR2A/NR2B receptora NMDA.

3. METODOLOGIA BADAŃ

Badania *in vivo*:

Doświadczenia przeprowadzono w dwóch modelach bólu neuropatycznego, z wykorzystaniem samców i samic myszy Albino Swiss (Charles River, Niemcy), zgodnie z wytycznymi IASP, Narodowych Instytutów Zdrowia oraz II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach zlokalizowanej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie (numery uchwał: 333/2017, 267/2020 - Ciapała i wsp., *Toxicol Appl Pharmacol*, 2023[170]; 218/2020, 319/2021, 99/2022 - *Int J Mol Sci*, 2023[171]; 252/2023, 128/2023, 124/2024 - *Pharmacol Rep*, 2024[172]; 75/2023, 18/2023, 153/2023, 242/2024, 243/2024 *Neurotherapeutics*, 2025[173]).

- **Model podwiązania nerwu kulszowego** (ang. *chronic constriction injury of the sciatic nerve* - **model CCI, Rycina 4 A**) został po raz pierwszy opisany przez Bennetta i Xie[174] i od wielu lat stosowany jest w badaniach prowadzonych w Zakładzie Farmakologii Bólu[32,39,46,175]. Procedurę chirurgiczną u myszy wykonano w warunkach sterylnych, w znieczuleniu izofluranem i polegała ona na oddzieleniu głowy bocznej mięśnia czterogłowowego (*m. vastus lateralis*) od mięśnia dwugłowowego uda (*m. biceps femoris*), dzięki czemu odsłonięto nerw kulszowy zlokalizowany pod mięśniem pośladkowym wielkim (*m. gluteus maximus*). Następnie przeprowadzono trzykrotne, luźne podwiązanie tego nerwu przy użyciu sterylnych, jedwabnych nici chirurgicznych (4/0), z zachowaniem 1 mm przerwy między podwiązaniami. Procedurę wykonywano tylko na prawej łapie. Wyniki opublikowano w 3 pracach oryginalnych Ciapała i wsp., *Toxicol Appl Pharmacol*, 2023[170], *Int J Mol Sci*, 2023[171], *Neurotherapeutics*, 2025[173].



Rycina 4. *Procedury eksperymentalne przeprowadzone w dwóch modelach bólu neuropatycznego u myszy.* ***Legenda:*** *i.t. – podanie podpajeczynówkowe, i.p. – podanie dootrzewnowe, i.v.-podanie dożylne*

- **Model neuropatii cukrzycowej wywołanej streptozotocyną** (ang. *streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain* – **model STZ, Rycina 4 B**), uzyskuje się poprzez pojedyncze, dootrzewnowe podanie streptozotocyny w dawce 200 mg/kg[176,177]. Substancja ta, zaliczana do antybiotyków o działaniu cytostatycznym, jest selektywnie transportowana do wnętrza komórki przez transportery GLUT2, znajdujące się m.in. w błonie komórek beta trzustki, powodując ich uszkodzenie[178], a w konsekwencji upośledzenie produkcji insuliny. Od 3 dnia po podaniu streptozotocyny obserwuje się znacznie podniesiony poziom glukozy we krwi (powyżej 300 mg/dL) pobieranej z żyły ogonowej, co świadczy o rozwijającej się cukrzycy typu 1. Wyniki opublikowano w 1 pracy oryginalnej Ciapała i wsp., *Pharmacol Rep*, 2024[172].

- **Badane substancje,** wymienione na **Rycinie 1**, były podawane jednorazowo lub wielokrotnie, drogą podpajęczynówkową (*i.t.;* Ciapała i wsp., *Toxicol Appl Pharmacol,* 2023[170], *Int J Mol Sci,* 2023[171], *Pharmacol Rep,* 2024[172], *Neurotherapeutics,* 2025[173]), dootrzewnową (*i.p.*; *Pharmacol Rep,* 2024[172], *Neurotherapeutics,* 2025[173]) lub dożylną (*i.v.*; *Toxicol Appl Pharmacol,* 2023[170]). Iniekcje podpajęczynówkowe u myszy wykonywano zgodnie z procedurą opisaną przez Hylden i Wilcox[179], polegającą na wprowadzeniu sterylnej igły (30 G) w przestrzeń międzykręgową w odcinku lędźwiowym kręgosłupa unieruchomionego zwierzęcia, pomiędzy L5-L6, a następnie podaniu danej substancji w objętości 5 µl. Iniekcje dootrzewnowe i dożylne przeprowadzano zgodnie z ogólnie dostępnymi wytycznymi[180–182], za każdym razem dostosowując ilość substancji do masy ciała zwierzęcia. W przypadku podań dożylnych wykonywano je po krótkim znieczuleniu izofluranem, zanurzając ogon w wodzie o temperaturze 40^0C, aby rozszerzyć naczynia krwionośne, a następnie sterylną igłę (27 G) wprowadzano pod odpowiednim kątem do żyły ogonowej i powoli podawano substancje w objętości 60 µl.
- **Testy behawioralne** miały na celu określenie stopnia nasilenia objawów bólu neuropatycznego Ciapała i wsp., *Toxicol Appl Pharmacol,* 2023[170], *Int J Mol Sci,* 2023[171], *Pharmacol Rep,* 2024[172], *Neurotherapeutics,* 2025[173]. Aby ocenić nadwrażliwość na bodźce dotykowe zastosowano **test von Freya**[32,46,171], który wykonywano poprzez umieszczenie myszy w przezroczystych klatkach ustawionych na metalowej, perforowanej platformie. Po okresie habituacji, do podeszwowej powierzchni tylnej łapy, przykładano kolejno kalibrowane włókna von Frey (Stoelting, USA) o rosnącej sile nacisku, w zakresie od 0.6-6.0 g. Za reakcję pozytywną uznawano szybkie cofnięcie łapy, potrząsanie nią lub lizanie miejsca kontaktu. W celu określenia nadwrażliwości na bodźce termiczne przeprowadzono **test zimnej płytki**[32,46,171], w którym myszy umieszczano pojedynczo na powierzchni metalowej płytki o temperaturze 2°C, kontrolowanej przy użyciu układu chłodzącego (Ugo Basile, Włochy). Po umieszczeniu zwierzęcia na płytce rozpoczynano pomiar czasu, aż do wystąpienia pierwszej reakcji behawioralnej charakterystycznej dla dyskomfortu termicznego, czyli uniesienia łapy, potrząsania nią, lizania lub skakania. Maksymalny czas ekspozycji ograniczono do 30 s, aby zapobiec hipotermii i uszkodzeniom tkanek. W przypadku wielokrotnych podań przeprowadzano także **test pręta obrotowego** (Ugo Basile, Włochy)[172,183], służący do oceny wpływu podawanych substancji na koordynację ruchową zwierząt. Myszy umieszczano na pręcie obracającym się z ustaloną prędkością i przyspieszeniem, a czas utrzymania się na nim bez upadku oceniano jako miarę sprawności motorycznej i równowagi.

Badania *ex vivo*:

W przeprowadzonych badaniach analizowano zmiany w ekspresji mRNA i białka na poziomie lędźwiowego (L4-L6) odcinka rdzenia kręgowego przy użyciu technik RT-qPCR i Western blot Ciapała i wsp., *Toxicol Appl Pharmacol,* 2023[170], *Neurotherapeutics,* 2025[173].

Analiza statystyczna:

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej wykonanej za pomocą oprogramowania GraphPad Prism, przy użyciu testu t-studenta lub jednoczynnikowej/ dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem *post-hoc* (poprawka Bonferroniego). Liczba wszystkich zwierząt wykorzystanych w badaniach wynosi 1314 myszy.

4. GŁÓWNE ZAGADNIENIA DOKTORATU

4.1. Rola szlaku kynureninowego w patogenezie bólu neuropatycznego – *praca przeglądowa* Ciapała i wsp., *International Journal of Molecular Sciences*, 2021

Identyfikacja nowych mechanizmów molekularnych leżących u podstaw powstawania bólu neuropatycznego stanowi jedno z kluczowych wyzwań współczesnej medycyny, otwierając perspektywę rozwoju skuteczniejszych terapii tego schorzenia. We wcześniejszych badaniach realizowanych w Zakładzie Farmakologii Bólu IF PAN zastosowano metodę mikromacierzy DNA, co pozwoliło na analizę zmian ekspresji genów indukowanych uszkodzeniem nerwu kulszowego oraz na wytypowanie nowych transkryptów zaangażowanych w rozwój bólu neuropatycznego[184]. Jednym z takich genów okazał się być *Kmo*, kodujący jeden z kluczowych enzymów szlaku kynureninowego. Szlak ten jest główną ścieżką katabolizmu tryptofanu, a jego metabolity, kynureniny, regulują liczne procesy biologiczne, w tym wpływają na pobudliwość neuronów oraz odpowiedź komórek glejowych i immunologicznych[185,186]. Jednakże wiedza na temat roli szlaku kynureninowego w transmisji nocyceptywnej wciąż wymaga zbadania. Wśród metabolitów szlaku kynureninowego szczególne zainteresowanie budzą dwa związki — kwas kynureninowy i kwas chinolinowy — ze względu na ich przeciwstawne właściwości biologiczne. Kwas chinolinowy jest selektywnym agonistą receptora NMDA, o dobrze już udokumentowanym działaniu neurotoksycznym. Natomiast kwas kynureninowy jako endogenny, nieselektywny antagonista receptorów glutaminergicznych (NMDA, AMPA i kainowych) odgrywa istotną rolę neuroprotekcyjną[185]. Ponadto badania *in vitro* dowodzą, że w ośrodkowym układzie nerwowym to w szczególności mikroglej i makrofagi są głównym źródłem kwasu chinolinowego[187], podczas gdy astrocyty odpowiadają za syntezę kwasu kynureninowego[188]. W neuropatii dochodzi do silnej aktywacji i napływu komórek mikrogleju/makrofagów, co prawdopodobnie prowadzi do zaburzenia równowagi w szlaku kynureninowym, a powstający kwas chinolinowy nasila procesy pronocyceptywne. Dlatego też poszczególne enzymy czy metabolity szlaku kynureninowego wydają się stanowić obiecujący punkt uchwytu w neuropatii, a także mogą stać się w przyszłości biomarkerami diagnostycznymi lub prognostycznymi. Warto zaznaczyć, że dotychczasowe badania kliniczne nad modulacją szlaku kynureninowego koncentrują się na inhibitorach dwóch jego enzymów, wspomnianego KMO, a także IDO, ocenianych do tej pory przede wszystkim w kontekście terapii przeciwnowotworowej.

Opublikowany przegląd literatury dostarcza kompleksowej analizy istotnych aspektów patofizjologii bólu neuropatycznego, ze szczególnym uwzględnieniem roli szlaku kynureninowego (Ciapała i wsp. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021)[80]. Opracowanie dostępnych danych pozwoliło dostrzec złożoną sieć zależności pomiędzy procesami metabolicznymi, immunologicznymi i neuronalnymi zachodzącymi w neuropatii. Jednocześnie zidentyfikowanie zagadnień, które nadal wymagają szerszych badań, stanowiło punkt wyjścia do zaplanowania eksperymentów których rezultaty zostały następnie opublikowane w 2 pracach oryginalnych (Ciapała i wsp., *Toxicol Appl Pharmacol*, 2023[170], *Neurotherapeutics*, 2025[173]) stanowiących podstawę niniejszej pracy doktorskiej.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Review

The Kynurenine Pathway as a Potential Target for Neuropathic Pain Therapy Design: From Basic Research to Clinical Perspectives

Katarzyna Ciapała, Joanna Mika * and Ewelina Rojewska *

Department of Pain Pharmacology, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, 31-343 Krakow, Poland; kat.ciapala@gmail.com
* Correspondence: joamika@if-pan.krakow.pl (J.M.); rojewska@if-pan.krakow.pl (E.R.); Tel.: +48-126-623-298 (J.M.); +48-126-623-260 (E.R.)

Abstract: Accumulating evidence suggests the key role of the kynurenine pathway (KP) of the tryptophan metabolism in the pathogenesis of several diseases. Despite extensive research aimed at clarifying the mechanisms underlying the development and maintenance of neuropathic pain, the roles of KP metabolites in this process are still not fully known. Although the function of the peripheral KP has been known for several years, it has only recently been acknowledged that its metabolites within the central nervous system have remarkable consequences related to physiology and behavior. Both the products and metabolites of the KP are involved in the pathogenesis of pain conditions. Apart from the neuroactive properties of kynurenines, the KP regulates several neurotransmitter systems in direct or indirect ways. Some neuroactive metabolites are known to have neuroprotective properties (kynurenic acid, nicotinamide adenine dinucleotide cofactor), while others are toxic (3-hydroxykynurenine, quinolinic acid). Numerous animal models show that modulation of the KP may turn out to be a viable target for the treatment of diseases. Importantly, some compounds that affect KP enzymes are currently described to possess analgesic properties. Additionally, kynurenine metabolites may be useful for assessing response to therapy or as biomarkers in therapeutic monitoring. The following review describes the molecular site of action and changes in the levels of metabolites of the kynurenine pathway in the pathogenesis of various conditions, with a particular emphasis on their involvement in neuropathy. Moreover, the potential clinical implications of KP modulation in chronic pain therapy as well as the directions of new research initiatives are discussed.

Keywords: tryptophan; kynurenines; neuropathy; metabolic pathway; analgesia; kynurenic acid; 3-hydroxykynurenine; quinolinic acid; neuropathy

check for updates

Citation: Ciapała, K.; Mika, J.; Rojewska, E. The Kynurenine Pathway as a Potential Target for Neuropathic Pain Therapy Design: From Basic Research to Clinical Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11055. https://doi.org/10.3390/ijms222011055

Academic Editor: István Szatmári

Received: 15 September 2021
Accepted: 9 October 2021
Published: 13 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

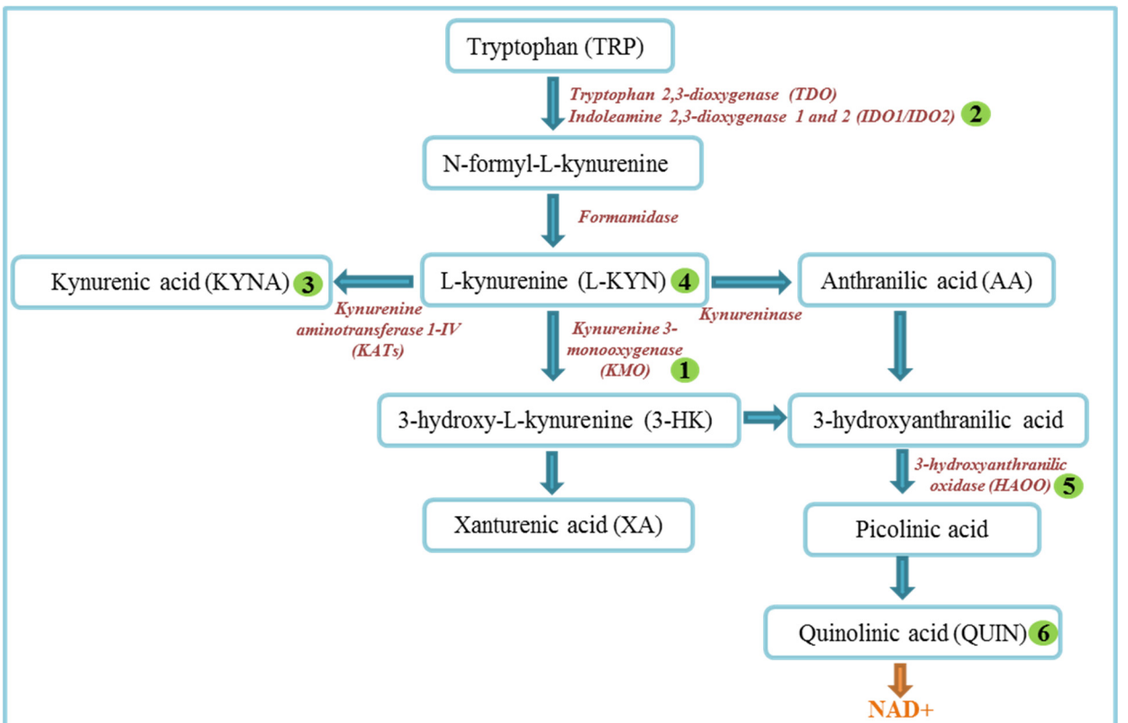
Pain is one of the most common symptoms that accompany many medical conditions. It acts as a part of the body's defense system, as it induces reflexive retraction from the painful stimulus and tendencies to avoid that dangerous situation in the future; therefore, it has relevant evolutionary functions. The International Association for the Study of Pain (IASP) proposed the following to define the condition of pain: "Pain is an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage or described in terms of such damage". Nociceptive pain refers to pain clearly associated with tissue damage or inflammation [1], while nociplastic pain arises from impaired nociception despite no signs of potential or fatal tissue damage and no signs of damage or disease to the somatosensory nervous system [2]. This definition de facto includes pain complaints that occur despite the lack of nociception or neuropathy. Taking into consideration that the integration of sensations, emotions, and cognition influences the perception of pain, the term of psychogenic pain was also distinguished. This pain occurs without anatomic tissue injury and it is considered to be caused by psychological factors such as depression

or anxiety [3]. Lesions or diseases of the somatosensory nervous system can result in the changed and disordered transmission of sensory signals to the spinal cord and brain, leading to the development of neuropathic pain [4]. This kind of pain is associated with conditions, such as spinal cord injury, stroke, multiple sclerosis, diabetes, cancer or can arise as a consequence of chemotherapy, or other inflammatory disorders [5]. As indicated by the research of van Hecke et al., 2014, the rates of morbidity have been divided into two groups: the first is chronic pain with neuropathic features (3–17% of the population), and the second is neuropathic pain associated with states such as painful diabetic peripheral neuropathy, post-herpetic neuralgia, trigeminal neuralgia, and glossopharyngeal neuralgia. Overall, according to this systematic review neuropathic pain affects approximately 7–10% of the general population [6]. People suffer from different sets of symptoms, including abnormal sensations (dysesthesia), pain caused by physiological, otherwise nonpainful stimuli of a continuous or paroxysmal nature (allodynia), or an exacerbated pain reaction to a noxious stimulus (hyperalgesia). Moreover, patients experience impressions, such as burning or coldness, tingling, numbness, or itching. Such manifestations can significantly decrease quality of life and negatively influence the physical, emotional, and social aspects of people's functioning [7]. Furthermore, this condition is associated with other problems, such as loss of function, anxiety, depression, sleep disturbance, and impaired cognition [8]. Worse still, studies conducted by the IASP have shown that neuropathic pain is not relieved by standard analgesics; hence, it frequently becomes a condition with no prospects for significant improvement. The weaker effects of two main groups of analgesics (opioids and nonsteroidal anti-inflammatory drugs) can be observed in neuropathic pain management. For this reason, neuropathic pain therapy requires a more complex approach. Some data suggest that it is possible to achieve a significant (30–50%) reduction in pain in only 50% of patients [9]. Currently, substances with a strong recommendation and proposed as first-line drugs are tricyclic antidepressants (TCAs), pregabalin, gabapentin, and serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs), whereas lidocaine, capsaicin patches, and tramadol are considered second-line treatments. Strong opioids, such as morphine and oxycodone, are suggested as third-line management, similar to botulinum toxin type A, which is recommended only for peripheral neuropathic pain or migraine [10,11]. Combined therapy is often used when treatment with one drug is not fully effective. Despite numerous clinical and experimental studies, the molecular mechanisms of the development and maintenance of neuropathic pain have not been fully clarified. Lesions, hypoxia, compression, inflammation, and chemical damage along the axons cause the degeneration of fibers and contribute to modifications in the expression of intracellular connections, which result in signal transmission disturbances [12]. As a consequence, an imbalance between excitatory and inhibitory signaling is present, which leads to the development of neuronal hypersensitivity in the central nervous system (CNS). Modified gene/protein expression in primary sensory neurons is believed to be the most important factor responsible for neuropathic pain progression. The alterations in ion channels, activation of immune cells, and release of glial mediators contribute to the sensitization of nociceptive pathways [13]. The shift in the microglial phenotype from a resting to an activated state appears to be especially significant since those cells, while activated, are a source of many pro-nociceptive compounds, such as chemokines, interleukins, growth factors, and other intracellular signaling molecules, which are responsible for the expansion of a neuroinflammatory cascade [14]. Overall, it is of great importance to understand the plastic changes within the nervous system after nerve injury because present pharmacotherapy focuses mostly on the alleviation of symptoms instead of treating the underlying pathophysiology. The development of an efficient, rational method for neuropathic pain relief is a major clinical issue. The lack of satisfactory therapeutic effects of third-level drugs of the analgesic ladder results in their increased dosage, which in turn leads to many adverse effects. Another major issue in the search for new forms of therapy is the necessity to perform preclinical studies using animal models. It is commonly known that there are differences and limitations between animal models of neuropathic pain and human neuropathy. However, a notable part of

our understanding of the mechanisms of nociception comes from animal research whose findings have led to the emergence of useful therapeutic strategies. The investigation of the molecular mechanisms of neuropathic pain and testing of compounds with potential beneficial properties requires proper animal models, which is an irreplaceable link between in vitro studies using cell lines and clinical trials. The analysis of neuroimmune interactions in neuropathic pain continually presents new questions, the answers to which require thorough research. Since the kynurenine pathway is closely related to the immune system, questions about its role in nociception have also been raised. The aim of this review is to evaluate the role of tryptophan and its metabolites in the pathogenesis of neuropathic pain, taking into account the role of products and enzymes of the kynurenine pathway in other diseases. We also focused on which substrates and enzymes within the TRP (kynurenine) catabolic pathway could serve as potential therapeutic targets.

2. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism

Tryptophan (TRP) is an endogenous amino acid necessary not only for protein synthesis but also as a precursor to the synthesis of biologically active molecules, including nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), nicotine acid, serotonin, and melatonin [15]. The kynurenine pathway (KP) and the better-known serotonin pathway are the two major routes of the TRP metabolism. The role of this amino acid in CNS functioning has been previously explored, mostly looking through the prism of serotonin, which is one of the best-known bioactive molecules. However, only 5% of dietary TRP is degraded to serotonin, whereas approximately 95% of TRP undergoes transformations through the KP, leading to the formation of kynurenines whose role is to regulate a plethora of biological processes, including the excitability of neurons, host–microbiome signaling, and the response of immune cells [16]. Tryptophan metabolism via the kynurenine pathway (Scheme 1) initiates with its conversion to N-formyl-L-kynurenine through three enzymes: tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 and 2 (IDO 1 and 2). N-formyl-L-kynurenine is rapidly converted to L-kynurenine, one of the major metabolites of the pathway. Subsequently, L-kynurenine can undergo three different transformations to kynurenic acid (KYNA) through the activities of the enzymes kynurenine aminotransferases (KATs) and 3-hydroxy-L-kynurenine (3-HK) with the participation of kynurenine 3-monooxygenase (KMO) and anthranilic acid (AA) due to kynureninase activity. In the next steps, 3-HK is modified to xanturenic acid (XA), while both 3-HK and anthranilic acid can be enzymatically converted to 3-hydroxyanthranilic acid. Next, 3-Hydroxyanthranilic acid is further metabolized by 3-hydroxyanthranilic oxidase (3-HAOO) to an unstable compound that is converted to picolinic acid and then nonenzymatically to quinolinic acid (QUIN), a precursor to the synthesis of NAD+ [15]. It is generally known that disorders of the CNS are often accompanied by disturbances in the TRP metabolism [17]. The products of the KP affect the endogenous regulation of neuronal excitability and mediate the regulation of the immune cell response, for example, via aryl hydrocarbon receptor (AhR) or G-protein coupled receptor 35 (GPR35). In recent years, the control of the kynurenine metabolism has been intensely studied, and many molecular sites and receptors have been proposed to be mediators of kynurenine action [18]. Among kynurenines, KYNA and QUIN are compounds that have gained great attention because they exert opposite properties—QUIN is a weak but specific agonist of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and, hence, it bears neurotoxic potential, while KYNA is an endogenous nonselective antagonist of all subtypes of glutamatenergic receptors taking part in pain transmission, including NMDA, AMPA, and kainite [16]. Therefore, the KP was traditionally divided into “neuroprotective” KYNA and “neurotoxic” QUIN branches [15]. However, a number of multifarious properties of kynurenine metabolites have been revealed in the last decade, which also revealed that KYNA may contribute to the cognitive-depleting effects in patients with Alzheimer’s disease [19]. There are reports suggesting that this effect depends on the dose of KYNA; at low doses KYNA produces cognitive enhancement [20].



Enzyme/Metabolite	Changes in neuropathic pain	Possible modulators
1 **KMO**	↑ mRNA/protein in 3th, 7th and 14th day after CCI in rats [21] ↑ mRNA in 2nd, 7th and 14th day after CCI in rats [22] ↑ mRNA in 7th day after SNI in mice [23]	**Minocycline** - ↓ KMO, ↓ mechanical and thermal hypersensitivity [21, 22] **Ro61-6048** (KMO inhibitor) - ↓ IL-6, NOS2, IBA-1, IL-1β, ↓ mechanical and thermal hypersensitivity, ↑ morphine effectiveness [21] **JM6** (Ro prodrug) - ↓ mechanical and thermal hypersensitivity, ↑ morphine effectiveness [21] **UPF 648** (KMO inhibitor) - ↓ mechanical and thermal hypersensitivity [22]
2 **IDO1/IDO2**	↑ IDO1 mRNA in 7th, 14th and 28th day after CCI in rats [22] ↑ IDO1 mRNA/protein 7th day after SNL in rats [24] ↑ IDO2 mRNA in 7th and 14th day after CCI in rats [22]	**1M-d-T** (IDO-2 inhibitor) - ↓ mechanical and thermal hypersensitivity [22] **PCC0208009** (IDO-1 inhibitor) - ↓ pain hypersensitivity, ↓ cognition impairment, ↓ anxiogenic behaviors [24]
3 **KYNA**	↑ KYNA level in spinal cord in rats after SNL [23]	**KYNA intrathecal injection** - ↓ mechanical and thermal hypersensitivity [25,26], ↑ morphine effectiveness [25]
4 **L-KYN**	No data	**L-KYN intraperitoneal injection** – ↓ mechanical hypersensitivity in rats after SNL [26]
5 **HAOO**	↑ mRNA in 2nd, 7th, 14th and 28th day after CCI in rats [22]	No data
6 **QUIN**	↑ QUIN level in rats after SNL [23]	No data

Scheme 1. The kynurenine pathway of tryptophan metabolism and summary of differences in this pathway occurring in neuropathic pain with presentation of possible modulators [21–26].

Moreover, both 3-hydroxykynureine and 3-hydroxyanthranilic acid have been related with both anti- and pro-oxidant properties [27]. Importantly, researchers focused on KP

investigation have to face some challenges, not only technical or methodological but also theoretical. What we know about TRP degradation via the KP does not always agree with experimental results, raising many questions [28]. First, the kynurenine pathway varies across different species; some studies have reported that KMO and IDO-1 activity is higher in gerbils than in rats and that rat models do not fully reflect the KP course in humans [29–31]. Additionally, the cellular localization of kynurenine pathway enzymes and products is a matter of crucial importance. In vitro studies have revealed that the physical segregation of KP branches occurs in CNS: microglia/macrophages, which become activated in various neuroimmunological diseases, are equipped to form products of the "neurotoxic" arm of the KP, while astrocytes are responsible for the synthesis of neuroprotective KYNA [32,33]. This, however, requires further investigation since kynurenine pathway dynamics change substantially under nontypical conditions, and there is still a lack of appropriate antibodies against KP enzymes to further immunohistochemical studies [28]. Another important issue is the fact that peripheral kynurenines, indeed, affect brain function, although these processes are not entirely known. Apart from L-kynurenine, which is actively transported into the brain by the large neutral amino acid transporter, kynurenine-derived metabolites cross the blood–brain barrier (BBB) poorly [34]. Therefore, the concentrations of KP metabolites in the CNS are controlled mostly by local enzyme activity. These issues become complicated when, under pathological circumstances, inflammation induces changes in blood–brain barrier permeability. Undoubtedly, this condition significantly influences the different stages of the KP.

3. Neuroactive Metabolites of Kynurenine Pathway

3.1. L-kynurenine

L-kynurenine (L-KYN) is the key metabolite of the KP and the starting point for the synthesis of all the other metabolites in the pathway. Approximately 60–80% of L-KYN in the CNS is derived from peripheral sources, since under physiological conditions L-KYN is actively transported across the blood–brain barrier via the large neutral amino acid transporter [34,35]. Following systemic immune activation, all L-KYN levels in the brain come from the periphery, whereas, when inflammation is restricted to the brain, L-KYN can be formed locally from TRP. Electrophysiological experiments focused on L-KYN, 3-HK, 3-hydroxyanthranilic acid (3-HANA), and anthranilic acid have not revealed any direct influence of these compounds on neuronal activity. Systemic or intracerebral L-KYN injection evokes convulsions and influences blood pressure; however, these effects result from L-KYN conversion to its neuroactive metabolites [36–38]. Additionally, L-KYN itself displays various functions, including both pro- and antioxidant effects [27,39–41] and has been suggested to be an AhR agonist, albeit with an unknown downstream impact [42]. In glioblastoma cells, it has been shown that L-KYN action via AhR suppresses the antitumor immune response and promotes the survival of neoplastic cells [42]. It has also been hypothesized that the L-kynurenine-AhR axis may play a role in neurodegeneration and brain damage [43–45]. Increased concentrations of L-KYN in the blood and the CNS reflect the enhanced metabolism of TRP; thus, it is used as a biomarker for many neurological diseases.

3.2. Kynurenic Acid

The 4-Hydroxyquinoline-2-carboxylic acid was discovered by German chemist Justus von Liebig in 1853 in dog urine; hence, it was named kynurenic acid. At the end of the 20th century, KYNA was found to be present in the brain, and it was shown to be a nonselective antagonist of three types of ionotropic receptors for excitatory amino acids: the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), kainic acid receptor (KAR), and α-amino-2,3-dihydro-5-methyl-3-oxo-isoxazolpropionic acid (AMPA) receptor, with the strongest inhibitory effect on glutamatergic transmission resulting from blocking the strychnine-independent glycine part of the NMDA receptor complex [46]. Moreover, KYNA was suggested to regulate cholinergic transmission by acting as a noncompetitive antagonist of α-7 nicotinic receptors; however, this hypothesis has recently become controversial [47,48]. The neuroprotective

effect of KYNA is mainly due to the inhibition of glutamate excitotoxicity through the antagonism of NMDAR. Importantly, approximately 80% of KYNA present in the brain is produced in glial cells, where it is not stored but released into the extracellular space by passive diffusion [34]. Carpenedo et al. have shown that the administration of even low concentrations of KYNA in the nanomolar range to the brain can reduce glutamate levels by 30–40%. This action involves blocking NMDA autoreceptors located on presynaptic nerve endings [49]. It was previously reported that a 2- or 3-fold increase in KYNA levels within the brain significantly diminishes post ischemic brain damage in in vivo models [50]. KYNA has also recently been shown to act as an agonist at GPR35, modulating cAMP production and preventing N-type Ca^{2+} channels in neurons and astrocytes [51]. Additionally, KYNA controls the immune response through its agonistic action at AhR, whose signaling appears to play an important role in inhibiting the release of cytokines in several types of immune cells, including macrophages [52]. KYNA levels are increased in the blood of patients suffering from multiple sclerosis [53], inflammatory bowel disease [54], and type 2 diabetes [55], while in the blood of patients with chronic schizophrenia [56], Alzheimer dementia [57], cluster headache [58], chronic migraine [59], and Parkinson's disease [57] KYNA levels are decreased. Interestingly, the recent review pointed out that lover levels of KYNA accompany psychiatric disorders affecting cognitive domains, but higher levels of KYNA are observed in patients suffering from schizophrenia [20,60–62]. In people affected by Huntington's disease, a reduction in KYNA in the cerebrospinal fluid and several brain regions was observed [60]. In patients suffering from rheumatoid arthritis, a positive correlation between serum KYNA and morning stiffness and pain was shown [61]. Additionally, it was observed that kynurenic acid exerts analgesic properties in an animal model of migraine, induced by dural inflammatory soup [62]. Therefore, it seems possible that pharmacological intervention affecting the production of KYNA—and at the same time the processes connected with the activity of excitatory amino acids in the CNS—may contribute to pain modulation.

3.3. 3-Hydroxy-L-kynurenine

Next, 3-Hydroxy-L-kynurenine (3-HK) is a metabolite of the KP, whose toxic effects are independent of the NMDA receptor, and is also a precursor to QUIN formation. Its neurotoxic properties are related to the production of free radicals [63], which in turn cause degeneration and apoptosis of neurons [39,64]. In addition, 3-HK generates the formation of superoxide and hydrogen peroxide, promoting copper-dependent oxidative damage to proteins [65]. In addition, it has recently been discovered that it has a negative impact on cell metabolism [66]. In contrast, some experimental studies have suggested that 3-HK displays antioxidant and scavenging properties because it acts as a two-electron donor; thus, it can restore the oxidative balance in the microenvironment [67]. Giles et al. proposed that the action of 3-HK depends on the redox status of the cell [68]. In the mammalian brain, 3-HK occurs in nanomolar amounts and is produced by activated macrophages and microglia. Stimulation of 3-HK has been observed in neurodegenerative diseases, such as hepatic encephalopathy, Huntington disease, Alzheimer's disease, and dementia [69,70].

3.4. Quinolinic Acid

Pyridine 2,3-dicarboxylic acid, commonly known as a quinolinic acid (QUIN), was demonstrated to be an agonist of NMDA receptors, specifically subtypes containing the NR2A and NR2B subunits [71]. Schwarcz et al. discovered that QUIN induces selective neuronal injury and that its administration into the striatum is followed by pathological neurochemical changes [72]. Among NMDAR agonists, QUIN does not have a high-affinity uptake system for its removal from the synapse; therefore, it continuously acts on NMDARs, resulting in damage and massive calcium entry into neurons and astrocytes [73]. Briefly, the neurotoxic potential of QUIN includes various mechanisms, such as the stimulation of glutamate release, the inhibition of glutamate uptake by astrocytes, the production of reactive oxygen species, the reduction of endogenous antioxidants, as

well as lipid peroxidation and cytoskeletal destabilization [71,74]. QUIN causes oxidative damage independent of its activity on the NMDA receptor through the formation of complexes with Fe^{2+}, which mediates ROS production [75]. Importantly, it was also found that QUIN inhibits B monoamine oxidase (MAO-B) in human brain synaptosomal mitochondria and influences gluconeogenesis in the liver; thus, metabolic impairments also accompany its neurotoxicity [76]. Additionally, QUIN has been proven to regulate the inflammatory response. Intrastriatal QUIN injection induces the expression of tumor necrosis alpha (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) [73]. Within the CNS, QUIN is produced mostly by activated microglia and macrophages [71]. The quantity of QUIN in the brain and cerebrospinal fluid is approximately <100 nM; however, during pathological states, QUIN levels increase up to 500–1200 nM [77]. A growing body of research indicates that changes in QUIN levels have been observed in many neurodegenerative and immune-mediated diseases. Elevated QUIN levels are observed in Huntington disease [78], Alzheimer's and Parkinson's disease [79], depression [80], amyotrophic lateral sclerosis [81], human immunodeficiency virus (HIV) [82], and other conditions [83]. Importantly, a recent study involving over 17,000 patients with chronic pain recognized QUIN as the most commonly elevated biomarker and the authors suggested that its role in nociception is associated with peripheral NMDAR activation [84]. Ongoing research is focused on the use of NMDA receptor antagonists as a key therapeutic strategy in pain disorders [85].

4. Major Enzymes of Kynurenine Pathway

4.1. Indolamine, 2,3-dioxygenase-1 and 2

Indolamine, 2,3-dioxygenase-1 (IDO1) and IDO2 are two related, initial rate-limiting enzymes (along with the unrelated enzyme TDO) in the KP and have aroused great interest with regard to inducing cancer immunosuppression, tumor development, and metastasis and neovascularization [86,87]. Although IDO1 and IDO2 share a high level of sequence identity, they exert notably different functions and kinetics. It was found that IDO1 is the high affinity enzyme with KM (Trp) = ~5 μM and IDO2 is the low affinity enzyme with KM (Trp) = ~100 μM, and IDO2 can catalyze the reaction even when Trp > 200 μM [88]. Moreover, it was suggested that IDO1 mediates T cell suppressive effects while IDO2 works directly in B cells as a proinflammatory mediator [89]. IDO1 is expressed in various immune and nonimmune tissues, whereas IDO2 is expressed mostly by antigen-presenting cells (APCs) of the immune system, including dendritic cells (DCs) and B cells [90]. However, studies on primary microglia and astrocyte cultures have proved that the IDO2 enzyme is also derived from microglial and macrophage cells [22,91,92]. IDOs participate in the natural defense against various pathogens and have an immunosuppressive function because of their ability to limit T cell function and evoke mechanisms of immune tolerance. The effects of IDO activation are mediated not only via INF-y and the reduced availability of tryptophan, but also by downstream KP metabolites. For example, L-KYN and KYNA are able to activate the AhR, which in turn induces increased expression of IDO and TDO, creating a positive feedback loop [91,93,94]. Currently, many studies have described changes in IDO1 and/or IDO2 in many pathological conditions, such as amyotrophic lateral sclerosis, autoimmune diseases, Huntington disease, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, cerebral ischemia, multiple sclerosis, as well as in tumors [91–99]. Many researchers have suggested that IDO2 could be an effective therapeutic target to treat inflammatory autoimmunity, while IDO1 has recently been under intense research focused on cancer immunotherapy. A few IDO1 inhibitors have been reported, some of which, including epacadostat, BMS986205, indoximod, and PF-06840003, among others, have advanced into clinical trials for cancer treatment [100].

4.2. Kynurenine-3-monooxygenase

The kynurenine-3-monooxygenase enzyme belongs to the NADPH-dependent flavin monooxygenase family [101]. Tissue distribution studies have shown that KMO in mammals is highly expressed within the liver and kidneys, while very low levels of this enzyme

have also been detected in the CNS [102]. Macrophages, microglia, monocytes, and endothelial cells are mostly responsible for KMO synthesis. This enzyme converts L-KYN to 3-HK and, therefore, is responsible for QUIN formation. KMO is induced by IFN-1β, IFN-6, TNF-α, and oxygen molecule (O_2), but inhibited by IL-4, IL-10, SOD, and by NADH which creates a negative feedback loop [103]. KMO expression levels are upregulated by proinflammatory cytokines, and an increased KMO metabolism results in the creation of compounds that activate glutamate receptors and elevate oxidative stress, which has fundamental consequences for CNS functioning. KMO plays a significant role in the regulation of peripheral inflammation [104] and central nervous system diseases [105]. In innate physiology, the KP participates in the regulation of early brain development [106]. It has been proven that the inhibition of KMO reduces the production of the "neurotoxic" branch of the KP and shifts the balance to the formation of KYNA. Therefore, KMO has become a very attractive drug target in many neurological diseases. However, KMO inhibitors have their limitations, mostly associated with poor blood–brain barrier permeability [107]. Over the years, many potent KMO inhibitors have been designed and confirmed to be beneficial in a variety of disease models. In the latest study, Zhang and colleagues created a new brain-permeable inhibitor of KMO [108]. Additionally, our previous study showed that at different time points after sciatic nerve injury (i.e., on days 3, 7, and 14) mRNA and *Kmo* protein levels in the spinal cord and dorsal root ganglia (DRG) increased. In 2014, we showed that the pharmacological inhibition of KMO weakened pain features and enhanced morphine effectiveness in a neuropathic pain model. We observed that chronic intraperitoneal or intrathecal administration of minocycline decreased pain and caused similar reductions in KMO mRNA levels in the spinal cord and the DRG. The inhibition of KMO has a therapeutic effect in several preclinical models of neuropathology, including neuropathic pain [21].

4.3. Kynurenine aminotransferases

Biologically active as homodimers, kynurenine aminotransferase (KAT) enzymes belong to the family of PLP-dependent enzymes and are involved in the production of neuroactive KYNA through the irreversible transamination of L-KYN [109]. KAT is distributed unevenly in the brain, with its highest activity observed in rhinencephalon and its lowest activity in the cerebellum, where it is mainly located in the cytoplasm of astrocytes and where only negligible amounts are present in nerve cells [110]. These relative proportions of the distribution of KAT are, however, different in the spinal cord. Almost the same amount of the enzyme is found both in glial cells and in neurons, with the enzyme concentrating in small grains bound to the cell membrane. Four KATs, I, II and III IV, have been identified in the mammalian brain [111]. KAT I, KAT II, and KAT III take part in the synthesis of KYNA and are characterized by different catalytic properties. It is likely that KAT II and III operate under physiological conditions, while KAT I may be of particular importance in pathological conditions, such as microglial activation. Since KYNA in the brain is mostly produced by KAT II, this enzyme is an important target for pharmacological modulation. [111,112]. However, the turnover kinetics of KAT II and KYNA, which could influence the duration of the pharmacological effect, have not been described thus far.

4.4. Kynureninase

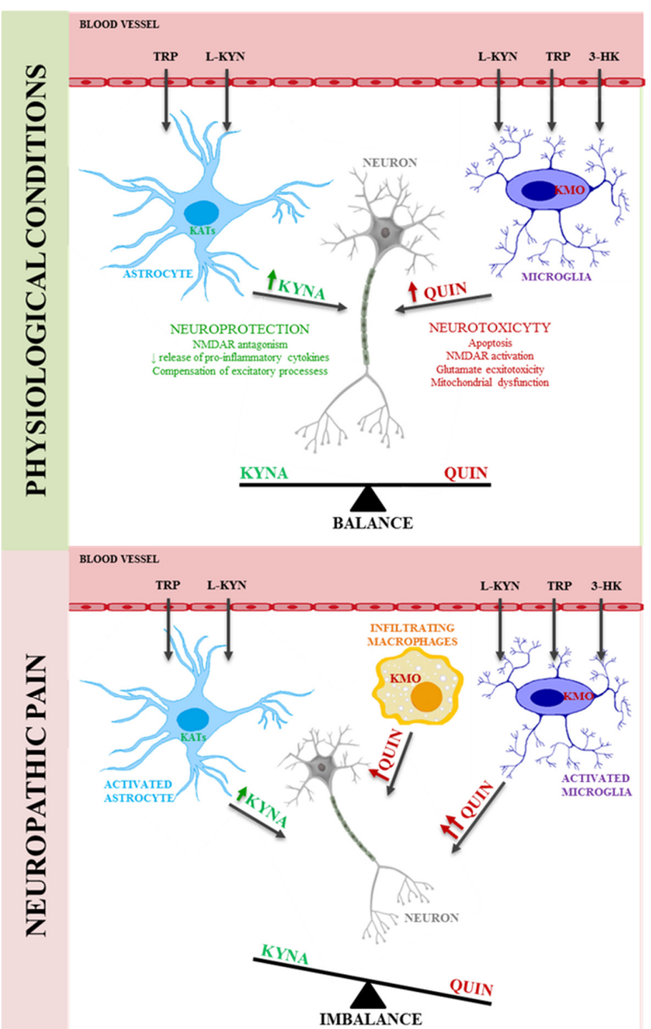
Kynureninase (KYNU) is a pyridoxal phosphate-dependent enzyme; attenuation of its activity in vitamin B6 deficiency leads to the conversion of 3-hydroxykynurenine and L-KYN to 3-HAA and AA, respectively [27]. KYNU is an enzyme necessary for the biosynthesis of nicotinamide nucleotides [113] and picolinic acid and enhances the synthesis of nitric oxide [27]. There is evidence that the stimulation of kynureninase activity is crucial in inflammatory processes. KYNU has been shown to increase in cerebral and systemic inflammatory conditions [114]. Moreover, IFN-gamma has been shown to elicit kynureninase activity in murine macrophages [113]. Thus far, a role for KYNU has been demonstrated in such chronic inflammatory skin diseases as psoriasis and atopic

dermatitis [115]. The role of this enzyme in general human immunology has not been extensively studied. KYNU is expressed in almost all body organs and is involved in various inflammatory and cardiovascular diseases [116]. Recently, its role in several types of cancers has been explored, especially in the development of breast tumors [117].

5. Kynurenine Pathway in Neuropathic Pain

A growing body of evidence indicates that sustained neuroinflammation contributes to pathological changes in the plasticity of sensory neurons, which, in turn, provokes chronic pain. Injuries and diseases that affect the nervous system can induce the activation of immune cells, alterations in capillary permeability, and the infiltration of peripheral blood cells. Taking into consideration the KP involvement in a plethora of physiological and pathological processes, and the fact that the source of its metabolites within the CNS are mainly glial cells, it becomes clear that glial cells should be the first target in order to define the role of kynurenines in neuropathic pain. First, Pineda-Farias et al. showed that intraperitoneal administration of L-kynurenine (50–200 mg/kg) and probenecid (100 mg/kg) diminished tactile hypersensitivity in rats exposed to spinal nerve ligation (SNL), which was associated with increased KYNA levels in the spinal cord [26]. An extensive screening study using DNA microarray revealed that one out of the genes whose expression was altered by chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI) in rats was *Kmo* [118]. Interestingly, the CCI-elevated mRNA level of *Kmo* was diminished in rats after chronic treatment with minocycline (a microglia/macrophage inhibitor). In the next study, it was proven that at different time points after a sciatic nerve injury, 2, 7, and 14 days after surgery, the mRNA and protein levels of KMO increased in the spinal cord and DRG. Additionally, these changes correlated with increased levels of microglial markers (CD40 and IBA-1) and astrocyte markers (GFAP). Moreover, the results showed that repeated intraperitoneal or intrathecal administrations of minocycline decreased the post injury elevated levels of *Kmo* mRNA in both examined structures, which was accompanied by reduced hypersensitivity to pain stimuli. Using primary glial cell cultures, it was confirmed that minocycline inhibited the LPS-stimulated increase in KMO mRNA in microglia but not in astroglia. The next stage explored the potential for the KMO inhibitors Ro61–6048 and JM6 to reduce neuropathic pain symptoms. Indeed, both substances reduced the mechanical and thermal hypersensitivity evoked by nerve injury, and a biochemical analysis indicated that Ro61–6048 reduced the levels of CD40/IBA1, IL-1β, IL-6, and NOS2 mRNA and/or proteins in both the spinal cord and DRG [21]. Recently, another study provided the first evidence that IDO1/2, KMO, and HAOO but not TDO elevated mRNA levels in the spinal cord, as measured on day 7 after the sciatic nerve injury in a rat model, parallel to C1q-positive cell activation. Extended pharmacological studies provided evidence that the repeated intraperitoneal administration of minocycline not only attenuated tactile and thermal hypersensitivity but also diminished the levels of IDO2 and KMO mRNA levels. Further pharmacological investigation confirmed that IDO2 and KMO enzymes take part in the development of neuropathic pain, in that it was observed that the repeated administration of IDO2 (1-M-d-T) and KMO (UPF 648) inhibitors diminished the development of hypersensitivity as measured on days 2 and 7 [22]. Using a spared sciatic nerve injury (SNI) model of neuropathic pain in mice, increased levels of Il-1β and *Kmo* mRNA in the contralateral side of the brain were found. The injury-induced increase in KMO mRNA was associated with the increased KMO protein and elevated QUIN and reduced KYNA levels in the contralateral hippocampus. The blockade of brain IL-1 signaling after SNI prevented the increase in KMO mRNA and depression-like behavior measured by the forced swim test, but had no effect on mechanical allodynia [23]. The importance of the IL-1β signaling pathway in the spinal cord has also been suggested to be crucial for the development of peripheral, IDO-1-mediated, injury-induced mechanical allodynia and depression-like behavior [119]. It has been demonstrated that the IDO1 inhibitor, PCC0208009, diminished pain hypersensitivity and cognition impairment in rats exposed to spinal nerve ligation [24]. Moreover, it has been shown that

the intrathecal administration of KYNA reduced mechanical and thermal hypersensitivity in CCI-exposed mice. GPR35, expressed within the CNS in both neuronal and nonneuronal cells, including glia, has been suggested to be responsible for this effect [25]. The analgesic action of KYNA via GPR35 is possible due to modulating hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels [120]. These results correspond with previous reports showing that in rat neuropathic pain models, KYNA administered intrathecally reversed tactile hypersensitivity [26]. Importantly, the intrathecal administration of KYNA not only diminishes mechanical and thermal hypersensitivity but also potentiates the analgesic properties of morphine; however, the clarification of this phenomenon requires further study. Interestingly, the KMO blockade by Ro61–6048 and JM6 enhanced morphine effectiveness, probably due to decreases in IL-1β and IL-6, which are known to exert opposing effects on morphine efficacy [21]. Overall, under neuropathic pain, due to the microglia/macrophages activation there is an imbalance between neuroprotective KYNA and neurotoxic QUIN production (Scheme 2) which might be relevant in designing new pharmacotherapy for neuropathic pain.



Scheme 2. The changes in kynurenine pathway in neuropathic pain within the central nervous

system. Under physiological conditions (**top panel**) there is a balance between neuroprotective KYNA produced by astrocytes and neurotoxic QUIN produced by microglia. In neuropathic pain (**bottom panel**), activation of microglia and infiltration of peripheral macrophages occur; therefore, as a consequence, the balance between KYNA and QUIN is disturbed.

6. Therapeutic Potential of the Kynurenine Pathway in the Treatment of Neuropathic Pain

The KP seems to be an important mediator in neuropathic pain pathology. It is possible that the modulation of its activity can be used in planning new treatment strategies. The mutual dependence between the mechanism of neuropathic pain and the activity of the kynurenine pathway will hopefully allow us to find a new mechanism of changes accompanying injury and create a possibility for using this knowledge in prophylaxis or therapeutic treatment. Management of neuropathic pain is consistently an enormous challenge for both health providers and patients. People affected by this kind of pain suffer from persistent symptoms that significantly reduce their quality of life, while doctors may propose treatment with a substance that gives only a partial improvement. In the context of the role of the kynurenine pathway in neuropathy, several points of interest in terms of pharmacological intervention can be distinguished. Most of them rely on manipulating the levels of neuroactive metabolites of this pathway. The first option is to use KMO inhibitors, since this enzyme initiates a cascade of transformations that result in the synthesis of the neurotoxin QUIN. This possibility is interesting because the results from basic, preclinical research indicate that these inhibitors indeed reduce hypersensitivity to mechanical and thermal stimuli. Moreover, from the therapeutic perspective, it is also significant that the inhibitors of KMO studied thus far intensify the analgesic effect of morphine. It is worth remembering that QUIN is also formed from anthranilic acid (Scheme 1); thus, the simultaneous use of an inhibitor of this enzyme could influence the analgesic effects of morphine. The direct precursor of QUIN is 3-hydroxyanthranilic acid, the modulation of which seems to be an interesting solution; however, the potential side effects should be taken into account, such as a decrease in the production of neuroprotective cinnabaric acid [121], which could be counterproductive.

Among the enzymes of the kynurenine pathway, IDO2 is an interesting target for therapeutic manipulation: its inhibition caused a decrease in hypersensitivity to mechanical and thermal stimuli after ligation of the sciatic nerve in an animal model of neuropathy. An extremely interesting compound is also KYNA, whose anticonvulsant and neuroprotective properties have previously been confirmed in numerous studies. There is a chance that pharmacological inhibition of QUIN production would result in a shift of the metabolic balance of the KP toward its neuroprotective branch (i.e., an increase in the synthesis of KYNA). It is worth noting that KYNA in combination with plasma proteins becomes practically impermeable to the BBB [34]. However, recently, there have been attempts to create nanoparticles that allow therapeutic amounts of kynurenic acid to penetrate the blood–brain barrier. The results of these experiments are very promising, showing that KYNA encapsulated in nanoparticles and administered peripherally to animals penetrates the blood–brain barrier and causes electrophysiological changes within the CNS [122]. Designing compounds comparable to KYNA in terms of chemical structure and biological activity remains a tremendous challenge. Several analogs of KYNA have already been synthesized: (2-(2-N,N-dimethylaminoethylamine-1-carbonyl)-1H-quinolin-4-one hydrochloride; KYNA-A1; 5,7-diBr-KYNA; 5,7-diCl-KYNA; 5-I,7-Cl-KYNA; and L-689,560), and their physical, chemical, and pharmacological properties are constantly being investigated. The recently discovered KYNA- or L-KYN-containing peptides are very promising in terms of pharmacological intervention. Kynurenine-containing peptides that influence opioid receptor activity have been previously isolated from natural organisms. Szűcs et al. designed and synthesized novel opioid peptide analogs combining L-KYN or KYNA in place of native amino acids. Importantly, this new, L-KYN-containing peptide displays a strong antinociceptive effect in in vivo tests [123]. It is worth mentioning because of the impact on the serotonin metabolism; the kynurenine pathway was already suggested to

be important in migraine attack and under migraine treatment [124,125]. The crosstalk between the kynurenine pathway and tetrahydrobiopterin (BH4) pathway has been recently raised as a very important factor in nociception processes. Recently, XA was recognized as an endogenous inhibitor of the BH4 metabolism which raises the possibility that XA can potentially modulate the pathological overproduction of BH4 reported in chronic pain hypersensitivity animal models [126]. Given the dynamically developing research on the role and effect of KP modulators, the possibility for their clinical use in the treatment of various CNS disorders is arousing increasing interest. Perhaps, in the future, these compounds may also be among the pathways supporting the treatment of neuropathic pain.

7. Conclusions

In this review, we highlight emerging evidence of kynurenine pathway involvement in the development of neuropathic pain and other conditions and KP modulation as a potential strategy for the management of this kind of pain. An increasing number of studies showing that kynurenine and its metabolites can directly or indirectly influence and control various classical neurotransmitter systems has broadened our knowledge and aroused greater interest in the role of the KP in nociception processes. In addition, as research has shown, pain, stress, and infections modulate the metabolism of the kynurenine pathway and cause serious changes in well-being. In the era of dynamically developing research on the kynurenine pathway, increasing interest has been aroused by the possibility for the clinical use of its metabolites, both in terms of the prediction of treatment effects as well as new possibilities in the treatment of CNS disorders. Therefore, there is a need to continue to expand research in this area, which in the future may allow for more effective therapy that is less burdensome for people affected by CNS disorders, reduce costs and, above all, improve the patient's quality of life. In the future, research should be directed towards identifying changes in tryptophan metabolism in people suffering from neuropathic pain of various etiologies. Moreover, keeping in mind that this kind of pain has a significantly higher prevalence among females compared with males, the gender differences are extremely important aspects, and relatively not yet explored in the matter of kynurenine pathway disturbances. Most likely, in the near future, new, thus far unknown, physiological and pathological properties of kynurenines will be discovered and interest in developing drugs based on modifications of the KP will increase. Complete knowledge of the KP will be critical to one of the major advances in medical research, by preventing disease rather than treating symptoms.

Author Contributions: Conceptualization, K.C., E.R.; writing—original draft preparation, K.C., E.R., writing—review and editing, K.C., E.R., J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the National Science Centre, Poland (SONATA 2015/17/D/NZ4/02284) and by statutory funds from the Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences, Department of Pain Pharmacology.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

1-M-d-T	1-Methyl-D-tryptophan
3-HANA	3-hydroxyanthranilic acid
3-HAOO	3-hydroxyanthranilic oxidase

3-HK-3	hydroxykinurenine
AA	anthranilic acid
AhR	aryl hydrocarbon receptor
AMPA	α-amino-2,3-dihydro-5-methyl-3-oxo-isoxazolpropionic acid
APCs	antigen-presenting cells
BBB	blood–brain barrier
BH4	tetrahydrobiopterin
C1q	complement component 1q
CCI	chronic constriction injury
CD40	cluster of differentiation 40
CNS	central nervous system
DCs	dendritic cells
DRG	dorsal root ganglia
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GPR35	G-protein coupled receptor 35
HCN channels	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide–gated channels
HIV	human immunodeficiency virus
IASP	The International Association for the Study of Pain
IBA-1	allograft inflammatory factor 1
IDO	indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN-1β	interferon beta -1
IFN-6	interferon-6
IFN-gamma	interferon gamma
IL-1	interleukin 1
IL-10	interleukin-10
IL-1β	interleukin 1 beta
IL-4	interleukin-4
IL-6	interleukin-6
KAR	kainic acid receptor
KATs	kynurenine aminotransferases
KM	Michaelis constant
KMO	kynurenine-3-monooxygenase
KP	kynurenine pathway
KYNA	kynureinc acid
KYNU	kynureninase
L-KYN	L-kynurenine
L-KYN	L-kynurenine
MAO-B	B monoamine oxidase
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NOS2	Nitric oxide synthase 2
QUIN	quinolinic acid
ROS	reactive oxygen species
SC	spinal cord
SNI	sciatic nerve injury
SNL	spinal nerve ligation
SNRIs	serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors
SOD	superoxide dismutase
TCAs	tricyclic antidepressants
TDO	tryptophan 2,3-dioxygenase
TNF-α	tumor necrosis alpha
TRP	tryptophan
UPF648	(1S,2S)-2-(3,4-Dichlorobenzoyl)cyclopropanecarboxylic acid
XA	xanturenic acid

References

1. Loeser, J.D.; Treede, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* **2008**, *137*, 473–477. [CrossRef] [PubMed]
2. Aydede, M.; Shriver, A. Recently introduced definition of "nociplastic pain" by the International Association for the Study of Pain needs better formulation. *Pain* **2018**, *159*, 1176–1177. [CrossRef] [PubMed]
3. Tanaka, M.; Török, N.; Tóth, F.; Szabó, Á.; Vécsei, L. Co-players in chronic pain: Neuroinflammation and the tryptophan-kynurenine metabolic pathway. *Biomedicines* **2021**, *9*, 897. [CrossRef]
4. Bouhassira, D. Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. *Rev. Neurol.* **2019**, *175*, 16–25. [CrossRef] [PubMed]
5. Colloca, L.; Ludman, T.; Bouhassira, D.; Baron, R.; Dickenson, A.H.; Yarnitsky, D.; Freeman, R.; Truini, A.; Attal, N.; Finnerup, N.B.; et al. Neuropathic pain. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2017**, *3*, 17002. [CrossRef]
6. van Hecke, O.; Austin, S.K.; Khan, R.A.; Smith, B.H.; Torrance, N. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. *Pain* **2014**, *155*, 654–662. [CrossRef]
7. Cavalli, E.; Mammana, S.; Nicoletti, F.; Bramanti, P.; Mazzon, E. The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2019**, *33*, 2058738419838383. [CrossRef]
8. Yawn, B.P.; Wollan, P.C.; Weingarten, T.N.; Watson, J.C.; Hooten, W.M.; Melton, L.J. The prevalence of neuropathic pain: Clinical evaluation compared with screening tools in a community population. *Pain Med.* **2009**, *10*, 586–593. [CrossRef]
9. Butera, J.A. Current and emerging targets to treat neuropathic pain. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2543–2546. [CrossRef]
10. Finnerup, N.B.; Attal, N.; Haroutounian, S.; McNicol, E.; Baron, R.; Dworkin, R.H.; Gilron, I.; Haanpää, M.; Hansson, P.; Jensen, T.S.; et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* **2015**, *14*, 162–173. [CrossRef]
11. Bates, D.; Carsten Schultheis, B.; Hanes, M.C.; Jolly, S.M.; Chakravarthy, K.V.; Deer, T.R.; Levy, R.M.; Hunter, C.W. A Comprehensive Algorithm for Management of Neuropathic Pain. *Pain Med.* **2019**, *20*, S2–S12. [CrossRef]
12. Fernandes, V.; Sharma, D.; Vaidya, S.; Shantanu, P.A.; Guan, Y.; Kalia, K.; Tiwari, V. Cellular and molecular mechanisms driving neuropathic pain: Recent advancements and challenges. *Expert Opin. Ther. Targets* **2018**, *22*, 131–142. [CrossRef]
13. Finnerup, N.B.; Kuner, R.; Jensen, T.S. Neuropathic pain: Frommechanisms to treatment. *Physiol. Rev.* **2021**, *101*, 259–301. [CrossRef] [PubMed]
14. Meacham, K.; Shepherd, A.; Mohapatra, D.P.; Haroutounian, S. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Curr. Pain Headache Rep.* **2017**, *21*, 28. [CrossRef] [PubMed]
15. Savitz, J. The kynurenine pathway: A finger in every pie. *Mol. Psychiatry* **2020**, *25*, 131–147. [CrossRef] [PubMed]
16. Badawy, A.A.B. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. *Int. J. Tryptophan Res.* **2017**, *10*, 1178646917691938. [CrossRef]
17. Höglund, E.; Øverli, Ø.; Winberg, S. Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: A comparative review. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 158. [CrossRef]
18. Vécsei, L.; Szalárdy, L.; Fülöp, F.; Toldi, J. Kynurenines in the CNS: Recent advances and new questions. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 64–82. [CrossRef]
19. Gulaj, E.; Pawlak, K.; Bien, B.; Pawlak, D. Kynurenine and its metabolites in Alzheimer's disease patients. *Adv. Med. Sci.* **2010**, *55*, 204–211. [CrossRef]
20. Tanaka, M.; Bohár, Z.; Vécsei, L. Are Kynurenines Accomplices or Principal Villains in Dementia? Maintenance of Kynurenine Metabolism. *Molecules* **2020**, *25*, 564. [CrossRef]
21. Rojewska, E.; Piotrowska, A.; Makuch, W.; Przewlocka, B.; Mika, J. Pharmacological kynurenine 3-monooxygenase enzyme inhibition significantly reduces neuropathic pain in a rat model. *Neuropharmacology* **2016**, *102*, 80–91. [CrossRef] [PubMed]
22. Rojewska, E.; Ciapała, K.; Piotrowska, A.; Makuch, W.; Mika, J. Pharmacological Inhibition of Indoleamine 2,3-Dioxygenase-2 and Kynurenine 3-Monooxygenase, Enzymes of the Kynurenine Pathway, Significantly Diminishes Neuropathic Pain in a Rat Model. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 724. [CrossRef] [PubMed]
23. Laumet, G.; Zhou, W.; Dantzer, R.; Edralin, J.D.; Huo, X.J.; Budac, D.P.; O'Connor, J.C.; Lee, A.W.; Heijnen, C.J.; Kavelaars, A. Upregulation of neuronal kynurenine 3-monooxygenase mediates depression-like behavior in a mouse model of neuropathic pain. *Brain. Behav. Immun.* **2017**, *66*, 94–102. [CrossRef] [PubMed]
24. Wang, Y.; Li, C.-M.; Han, R.; Wang, Z.-Z.; Gao, Y.-L.; Zhu, X.-Y.; Yu, X.; Du, G.-Y.; Wang, H.-B.; Tian, J.-W.; et al. PCC0208009, an indirect IDO1 inhibitor, alleviates neuropathic pain and co-morbidities by regulating synaptic plasticity of ACC and amygdala. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, *177*, 113926. [CrossRef] [PubMed]
25. Rojewska, E.; Ciapała, K.; Mika, J. Kynurenic acid and zaprinast diminished CXCL17-evoked pain-related behaviour and enhanced morphine analgesia in a mouse neuropathic pain model. *Pharmacol. Rep.* **2019**, *71*, 139–148. [CrossRef] [PubMed]
26. Pineda-Farias, J.B.; Pérez-Severiano, F.; González-Esquivel, D.F.; Barragán-Iglesias, P.; Bravo-Hernández, M.; Cervantes-Durán, C.; Aguilera, P.; Ríos, C.; Granados-Soto, V. The l -kynurenine-probenecid combination reduces neuropathic pain in rats. *Eur. J. Pain* **2013**, *17*, 1365–1373. [CrossRef]
27. Reyes Ocampo, J.; Lugo Huitrón, R.; González-Esquivel, D.; Ugalde-Muñiz, P.; Jiménez-Anguiano, A.; Pineda, B.; Pedraza-Chaverri, J.; Ríos, C.; Pérez de la Cruz, V. Kynurenines with neuroactive and redox properties: Relevance to aging and brain diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 646909. [CrossRef]
28. Schwarcz, R.; Stone, T.W. The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology* **2017**, *112*, 237–247. [CrossRef]

29. Murakami, Y.; Saito, K. Species and cell types difference in tryptophan metabolism. *Int. J. Tryptophan Res.* **2013**, *6*, 47–54. [CrossRef]
30. Heyes, M.P.; Saito, K.; Chen, C.Y.; Proescholdt, M.G.; Nowak, T.S.; Li, J.; Beagles, K.E.; Proescholdt, M.A.; Zito, M.A.; Kawai, K.; et al. Species heterogeneity between gerbils and rats: Quinolinate production by microgila and astrocytes and accumulations in response to ischemic brain injury and systemic immune activation. *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 1519–1529. [CrossRef]
31. Jovanovic, F.; Candido, K.D.; Knezevic, N.N. The role of the kynurenine signaling pathway in different chronic pain conditions and potential use of therapeutic agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6045. [CrossRef]
32. Guillemin, G.J.; Kerr, S.J.; Smythe, G.A.; Smith, D.G.; Kapoor, V.; Armati, P.J.; Croitoru, J.; Brew, B.J. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: A paradox for neuronal protection. *J. Neurochem.* **2001**, *78*, 842–853. [CrossRef]
33. Guillemin, G.J.; Smith, D.G.; Smythe, G.A.; Armati, P.J.; Brew, B.J. Expression of the kynurenine pathway enzymes in human microglia and macrophages. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2003**, *527*, 105–112.
34. Fukui, S.; Schwarcz, R.; Rapoport, S.I.; Takada, Y.; Smith, Q.R. Blood-Brain Barrier Transport of Kynurenines: Implications for Brain Synthesis and Metabolism. *J. Neurochem.* **1991**, *56*, 2007–2017. [CrossRef]
35. Kita, T.; Morrison, P.F.; Heyes, M.P.; Markey, S.P. Effects of systemic and central nervous system localized inflammation on the contributions of metabolic precursors to the l-kynurenine and quinolinic acid pools in brain. *J. Neurochem.* **2002**, *82*, 258–268. [CrossRef]
36. Lapin, I.P. Depressor effect of kynurenine and its metabolites in rats. *Life Sci.* **1976**, *19*, 1479–1483. [CrossRef]
37. Lapin, I.P. Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. *J. Neural Transm.* **1978**, *42*, 37–43. [CrossRef] [PubMed]
38. Pinelli, A.; Ossi, C.; Colombo, R.; Tofanetti, O.; Spazzi, L. Experimental convulsions in rats induced by intra ventricular administration of kynurenine and structurally related compounds. *Neuropharmacology* **1984**, *23*, 333–337. [CrossRef]
39. Okuda, S.; Nishiyama, N.; Saito, H.; Katsuki, H. 3-Hydroxykynurenine, an Endogenous Oxidative Stress Generator, Causes Neuronal Cell Death with Apoptotic Features and Region Selectivity. *J. Neurochem.* **2002**, *70*, 299–307. [CrossRef] [PubMed]
40. Peyrot, F.; Ducrocq, C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J. Pineal Res.* **2008**, *45*, 235–246. [CrossRef] [PubMed]
41. Song, H.; Park, H.; Kim, Y.-S.; Kim, K.D.; Lee, H.-K.; Cho, D.-H.; Yang, J.-W.; Hur, D.Y. l-Kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11*, 932–938. [CrossRef]
42. Opitz, C.A.; Litzenburger, U.M.; Sahm, F.; Ott, M.; Tritschler, I.; Trump, S.; Schumacher, T.; Jestaedt, L.; Schrenk, D.; Weller, M.; et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **2011**, *478*, 197–203. [CrossRef]
43. Cuartero, M.I.; de la Parra, J.; García-Culebras, A.; Ballesteros, I.; Lizasoain, I.; Moro, M.Á. The Kynurenine Pathway in the Acute and Chronic Phases of Cerebral Ischemia. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22*, 1060–1073. [CrossRef] [PubMed]
44. Vamos, E.; Pardutz, A.; Klivenyi, P.; Toldi, J. The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: Possibilities for neuroprotection. *J. Neurol. Sci.* **2009**, *283*, 21–27. [CrossRef] [PubMed]
45. Zádori, D.; Klivényi, P.; Vámos, E.; Fülöp, F.; Toldi, J.; Vécsei, L. Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: Future therapeutic strategies. *J. Neural Transm.* **2009**, *116*, 1403–1409. [CrossRef] [PubMed]
46. Perkins, M.N.; Stone, T.W. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res.* **1982**, *247*, 184–187. [CrossRef]
47. Hilmas, C.; Pereira, E.F.R.; Alkondon, M.; Rassoulpour, A.; Schwarcz, R.; Albuquerque, E.X. The Brain Metabolite Kynurenic Acid Inhibits α7 Nicotinic Receptor Activity and Increases Non-α7 Nicotinic Receptor Expression: Physiopathological Implications. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 7463–7473. [CrossRef]
48. Stone, T.W. Does kynurenic acid act on nicotinic receptors? An assessment of the evidence. *J. Neurochem.* **2020**, *152*, 627–649. [CrossRef]
49. Carpenedo, R.; Chiarugi, A.; Russi, P.; Lombardi, G.; Carlà, V.; Pellicciari, R.; Mattoli, L.; Moroni, F. Inhibitors of kynurenine hydroxylase and kynureninase increase cerebral formation of kynurenate and have sedative and anticonvulsant activities. *Neuroscience* **1994**, *61*, 237–244. [CrossRef]
50. Cozzi, A.; Carpenedo, R.; Moroni, F. Kynurenine hydroxylase inhibitors reduce ischemic brain damage: Studies with (m-nitrobenzoyl)-alanine (mNBA) and 3,4-dimethoxy-[-N-4- (nitrophenyl)thiazol-2YL]-benzenesulfonamide (Ro 61-8048) in models of focal or global brain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1999**, *19*, 771–777. [CrossRef]
51. Wang, J.; Simonavicius, N.; Wu, X.; Swaminath, G.; Reagan, J.; Tian, H.; Ling, L. Kynurenic Acid as a Ligand for Orphan G Protein-coupled Receptor GPR35. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 22021–22028. [CrossRef]
52. DiNatale, B.C.; Murray, I.A.; Schroeder, J.C.; Flaveny, C.A.; Lahoti, T.S.; Laurenzana, E.M.; Omiecinski, C.J.; Perdew, G.H. Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol. Sci.* **2010**, *115*, 89–97. [CrossRef]
53. Hartai, Z.; Klivenyi, P.; Janaky, T.; Penke, B.; Dux, L.; Vecsei, L. Kynurenine metabolism in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* **2005**, *112*, 93–96. [CrossRef]
54. Forrest, C.M.; Gould, S.R.; Darlington, L.G.; Stone, T.W. Levels of purine, kynurenine and lipid peroxidation products in patients with inflammatory bowel disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2003**, *527*, 395–400. [CrossRef] [PubMed]
55. Oxenkrug, G.F. Increased Plasma Levels of Xanthurenic and Kynurenic Acids in Type 2 Diabetes. *Mol. Neurobiol.* **2015**, *52*, 805–810. [CrossRef] [PubMed]

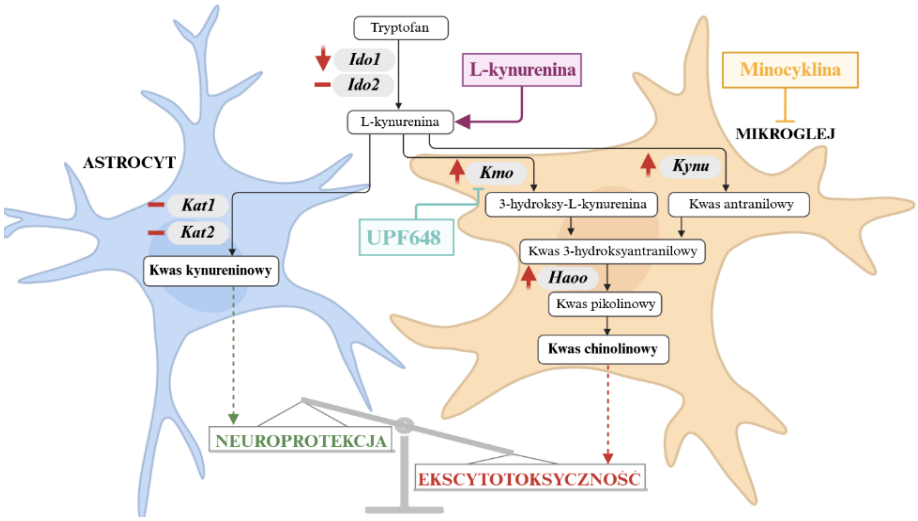
56. Szymona, K.; Zdzisińska, B.; Karakuła-Juchnowicz, H.; Kocki, T.; Kandefer-Szerszeń, M.; Flis, M.; Rosa, W.; Urbańska, E.M. Correlations of Kynurenic Acid, 3-Hydroxykynurenine, sIL-2R, IFN-α, and IL-4 with Clinical Symptoms During Acute Relapse of Schizophrenia. *Neurotox. Res.* **2017**, *32*, 17–26. [CrossRef] [PubMed]
57. Hartai, Z.; Juhász, A.; Rimanóczy, Á.; Janáky, T.; Donkó, T.; Dux, L.; Penke, B.; Tóth, G.K.; Janka, Z.; Kálmán, J. Decreased serum and red blood cell kynurenic acid levels in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **2007**, *50*, 308–313. [CrossRef] [PubMed]
58. Curto, M.; Lionetto, L.; Negro, A.; Capi, M.; Perugino, F.; Fazio, F.; Giamberardino, M.A.; Simmaco, M.; Nicoletti, F.; Martelletti, P. Altered serum levels of kynurenine metabolites in patients affected by cluster headache. *J. Headache Pain* **2016**, *17*, 27. [CrossRef]
59. Curto, M.; Lionetto, L.; Negro, A.; Capi, M.; Fazio, F.; Giamberardino, M.A.; Simmaco, M.; Nicoletti, F.; Martelletti, P. Altered kynurenine pathway metabolites in serum of chronic migraine patients. *J. Headache Pain* **2015**, *17*, 47. [CrossRef]
60. Beal, M.F.; Matson, W.R.; Storey, E.; Milbury, P.; Ryan, E.A.; Ogawa, T.; Bird, E.D. Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex. *J. Neurol. Sci.* **1992**, *108*, 80–87. [CrossRef]
61. Parada-Turska, J.; Zgrajka, W.; Majdan, M.; Lisse, J.; Westlund, K.N. Kynurenic acid in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, and osteoarthritis. *J. Rheumatol.* **2013**, *40*, 903–909. [CrossRef]
62. Spekker, E.; Laborc, K.F.; Bohár, Z.; Nagy-Grócz, G.; Fejes-Szabó, A.; Szűcs, M.; Vécsei, L.; Párdutz, Á. Effect of dural inflammatory soup application on activation and sensitization markers in the caudal trigeminal nucleus of the rat and the modulatory effects of sumatriptan and kynurenic acid. *J. Headache Pain* **2021**, *22*, 17. [CrossRef]
63. Eastman, C.L.; Guilarte, T.R. Cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine in a neuronal hybrid cell line. *Brain Res.* **1989**, *495*, 225–231. [CrossRef]
64. Chiarugi, A.; Meli, E.; Moroni, F. Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid. *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 1310–1318. [CrossRef] [PubMed]
65. Goldstein, L.E.; Leopold, M.C.; Huang, X.; Atwood, C.S.; Saunders, A.J.; Hartshorn, M.; Lim, J.T.; Faget, K.Y.; Muffat, J.A.; Scarpa, R.C.; et al. 3-Hydroxykynurenine and 3-Hydroxyanthranilic Acid Generate Hydrogen Peroxide and Promote α-Crystallin Cross-Linking by Metal Ion Reduction. *Biochemistry* **2000**, *39*, 7266–7275. [CrossRef] [PubMed]
66. Reyes-Ocampo, J.; Ramírez-Ortega, D.; Vázquez Cervantes, G.I.; Pineda, B.; Montes de Oca Balderas, P.; González-Esquivel, D.; Sánchez-Chapul, L.; Lugo-Huitrón, R.; Silva-Adaya, D.; Ríos, C.; et al. Mitochondrial dysfunction related to cell damage induced by 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid: Non-dependent-effect of early reactive oxygen species production. *Neurotoxicology* **2015**, *50*, 81–91. [CrossRef]
67. Colín-González, A.L.; Maldonado, P.D.; Santamaría, A. 3-Hydroxykynurenine: An intriguing molecule exerting dual actions in the Central Nervous System. *Neurotoxicology* **2013**, *34*, 189–204. [CrossRef]
68. Giles, G.I.; Collins, C.A.; Stone, T.W.; Jacob, C. Electrochemical and in vitro evaluation of the redox-properties of kynurenine species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *300*, 719–724. [CrossRef]
69. Bonda, D.J.; Mailankot, M.; Stone, J.G.; Garrett, M.R.; Staniszewska, M.; Castellani, R.J.; Siedlak, S.L.; Zhu, X.; Lee, H.; Perry, G.; et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and 3-hydroxykynurenine modifications are found in the neuropathology of Alzheimer's disease. *Redox Rep.* **2010**, *15*, 161–168. [CrossRef] [PubMed]
70. Pearson, S.J.; Reynolds, G.P. Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease. *Neurosci. Lett.* **1992**, *144*, 199–201. [CrossRef]
71. Guillemin, G.J. Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J.* **2012**, *279*, 1356–1365. [CrossRef]
72. Schwarcz, R.; Whetsell, W.O.; Mangano, R.M. Quinolinic acid: An endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* **1983**, *219*, 316–318. [CrossRef]
73. Lugo-Huitrón, R.; Ugalde Muñiz, P.; Pineda, B.; Pedraza-Chaverrí, J.; Ríos, C.; Pérez-De La Cruz, V. Quinolinic acid: An endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, *2013*, 104024. [CrossRef] [PubMed]
74. Pérez-De La Cruz, V.; Konigsberg, M.; Pedraza-Chaverri, J.; Herrera-Mundo, N.; Díaz-Muñoz, M.; Morán, J.; Fortoul-Van Der Goes, T.; Rondán-Zárate, A.; Maldonado, P.D.; Ali, S.F.; et al. Cytoplasmic calcium mediates oxidative damage in an excitotoxic/energetic deficit synergic model in rats. *Eur. J. Neurosci.* **2008**, *27*, 1075–1085. [CrossRef]
75. Stipek, S.; Stastny, F.; Platenik, J.; Crkovska, J.; Zima, T. The effect of quinolinate on rat brain lipid peroxidation is dependent on iron. *Neurochem. Int.* **1997**, *30*, 233–237. [CrossRef]
76. Naoi, M.; Ishiki, R.; Nomura, Y.; Hasegawa, S.; Nagatsu, T. Quinolinic acid: An endogenous inhibitor specific for type B monoamine oxidase in human brain synaptosomes. *Neurosci. Lett.* **1987**, *74*, 232–236. [CrossRef]
77. Braidy, N.; Grant, R.; Brew, B.J.; Adams, S.; Jayasena, T.; Guillemin, G.J. Effects of kynurenine pathway metabolites on intracellular NAD+ synthesis and cell death in human primary astrocytes and neurons. *Int. J. Tryptophan Res.* **2009**, *2*, 61–69. [CrossRef]
78. Guidetti, P.; Luthi-Carter, R.E.; Augood, S.J.; Schwarcz, R. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* **2004**, *17*, 455–461. [CrossRef] [PubMed]
79. Sorgdrager, F.J.H.; Vermeiren, Y.; Faassen, M.; Ley, C.; Nollen, E.A.A.; Kema, I.P.; De Deyn, P.P. Age- and disease-specific changes of the kynurenine pathway in Parkinson's and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2019**, *151*, 656–668. [CrossRef] [PubMed]
80. Steiner, J.; Walter, M.; Gos, T.; Guillemin, G.J.; Bernstein, H.G.; Sarnyai, Z.; Mawrin, C.; Brisch, R.; Bielau, H.; zu Schwabedissen, L.M.; et al. Severe depression is associated with increased microglial quinolinic acid in subregions of the anterior cingulate gyrus: Evidence for an immune-modulated glutamatergic neurotransmission? *J. Neuroinflammation* **2011**, *8*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
81. Chen, Y.; Stankovic, R.; Cullen, K.M.; Meininger, V.; Garner, B.; Coggan, S.; Grant, R.; Brew, B.J.; Guillemin, G.J. The kynurenine pathway and inflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotox. Res.* **2010**, *18*, 132–142. [CrossRef] [PubMed]

82. Heyes, M.P.; Saito, K.; Lackner, A.; Wiley, C.A.; Achim, C.L.; Markey, S.P. Sources of the neurotoxin quinolinic acid in the brain of HIV-1-infected patients and retrovirus-infected macaques. *FASEB J.* **1998**, *12*, 881–896. [CrossRef]
83. Stone, T.W. Endogenous neurotoxins from tryptophan. *Toxicon* **2001**, *39*, 61–73. [CrossRef]
84. Gunn, J.; Hill, M.M.; Cotton, B.M.; Deer, T.R. An analysis of biomarkers in patients with chronic pain. *Pain Physician* **2020**, *23*, E41–E49. [CrossRef] [PubMed]
85. Thompson, T.; Whiter, F.; Gallop, K.; Veronese, N.; Solmi, M.; Newton, P.; Stubbs, B. NMDA receptor antagonists and pain relief: A meta-analysis of experimental trials. *Neurology* **2019**, *92*, E1652–E1662. [CrossRef]
86. Johnson, T.S.; Munn, D.H. Host indoleamine 2,3-dioxygenase: Contribution to systemic acquired tumor tolerance. *Immunol. Investig.* **2012**, *41*, 765–797. [CrossRef]
87. Huang, Y.S.; Ogbechi, J.; Clanchy, F.I.; Williams, R.O.; Stone, T.W. IDO and Kynurenine Metabolites in Peripheral and CNS Disorders. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 388. [CrossRef]
88. Kashi, A.A.; Davis, R.W.; Phair, R.D. The IDO Metabolic Trap Hypothesis for the Etiology of ME/CFS. *Diagnostics* **2019**, *9*, 82. [CrossRef]
89. Merlo, L.M.F.; DuHadaway, J.B.; Montgomery, J.D.; Peng, W.-D.; Murray, P.J.; Prendergast, G.C.; Caton, A.J.; Muller, A.J.; Mandik-Nayak, L. Differential Roles of IDO1 and IDO2 in T and B Cell Inflammatory Immune Responses. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1861. [CrossRef]
90. Bilir, C.; Sarisozen, C. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): Only an enzyme or a checkpoint controller? *J. Oncol. Sci.* **2017**, *3*, 52–56. [CrossRef]
91. Munn, D.H.; Mellor, A.L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1147–1154. [CrossRef] [PubMed]
92. Widner, B.; Leblhuber, F.; Walli, J.; Tilz, G.P.; Demel, U.; Fuchs, D. Degradation of tryptophan in neurodegenerative disorders. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1999**, *467*, 133–138. [CrossRef] [PubMed]
93. Muller, A.J.; DuHadaway, J.B.; Donover, P.S.; Sutanto-Ward, E.; Prendergast, G.C. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 312–319. [CrossRef] [PubMed]
94. Darlington, L.G.; Mackay, G.M.; Forrest, C.M.; Stoy, N.; George, C.; Stone, T.W. Altered kynurenine metabolism correlates with infarct volume in stroke. *Eur. J. Neurosci.* **2007**, *26*, 2211–2221. [CrossRef] [PubMed]
95. Opitz, C.A.; Wick, W.; Steinman, L.; Platten, M. Tryptophan degradation in autoimmune diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 2542–2563. [CrossRef]
96. Zelante, T.; Fallarino, F.; Bistoni, F.; Puccetti, P.; Romani, L. Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: The paradox of an evasive strategy that benefits the host. *Microbes Infect.* **2009**, *11*, 133–141. [CrossRef]
97. Sage, L.K.; Fox, J.M.; Mellor, A.L.; Tompkins, S.M.; Tripp, R.A. Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Activity During the Primary Immune Response to Influenza Infection Modifies the Memory T Cell Response to Influenza Challenge. *Viral Immunol.* **2014**, *27*, 112–123. [CrossRef]
98. Mazarei, G.; Leavitt, B.R. Indoleamine 2,3 Dioxygenase as a Potential Therapeutic Target in Huntington's Disease. *J. Huntingtons. Dis.* **2015**, *4*, 109–118. [CrossRef] [PubMed]
99. Laugeray, A.; Launay, J.M.; Callebert, J.; Surget, A.; Belzung, C.; Barone, P.R. Peripheral and cerebral metabolic abnormalities of the tryptophan-kynurenine pathway in a murine model of major depression. *Behav. Brain Res.* **2010**, *210*, 84–91. [CrossRef]
100. Tang, K.; Wu, Y.H.; Song, Y.; Yu, B. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors in clinical trials for cancer immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.* **2021**, *14*, 68. [CrossRef]
101. Lu, Y.; Shao, M.; Wu, T. Kynurenine-3-monooxygenase: A new direction for the treatment in different diseases. *Food Sci. Nutr.* **2020**, *8*, 711–719. [CrossRef]
102. Courtney, S.; Scheel, A. *Modulation of the Kynurenine Pathway for the Potential Treatment of Neurodegenerative Diseases*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 149–176.
103. Tanaka, M.; Tóth, F.; Polyák, H.; Szabó, Á.; Mándi, Y.; Vécsei, L. Immune Influencers in Action: Metabolites and Enzymes of the Tryptophan-Kynurenine Metabolic Pathway. *Biomedicines* **2021**, *9*, 734. [CrossRef]
104. Wilson, K.; Auer, M.; Binnie, M.; Zheng, X.; Pham, N.T.; Iredale, J.P.; Webster, S.P.; Mole, D.J. Overexpression of human kynurenine-3-monooxygenase protects against 3-hydroxykynurenine-mediated apoptosis through bidirectional nonlinear feedback. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2197. [CrossRef]
105. Mithaiwala, M.N.; Santana-Coelho, D.; Porter, G.A.; O'Connor, J.C. Neuroinflammation and the Kynurenine Pathway in CNS Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells* **2021**, *10*, 1548. [CrossRef]
106. Forrest, C.M.; Kennedy, P.G.E.; Rodgers, J.; Dalton, R.N.; Turner, C.; Darlington, L.G.; Cobb, S.R.; Stone, T.W. Kynurenine pathway metabolism following prenatal KMO inhibition and in Mecp2+/− mice, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Neurochem. Int.* **2016**, *100*, 110–119. [CrossRef]
107. Zhang, S.; Collier, M.E.W.; Heyes, D.J.; Giorgini, F.; Scrutton, N.S. Advantages of brain penetrating inhibitors of kynurenine-3-monooxygenase for treatment of neurodegenerative diseases. *Arch. Biochem. Biophys.* **2021**, *697*, 108702. [CrossRef]
108. Zhang, S.; Sakuma, M.; Deora, G.S.; Levy, C.W.; Klausing, A.; Breda, C.; Read, K.D.; Edlin, C.D.; Ross, B.P.; Wright Muelas, M.; et al. A brain-permeable inhibitor of the neurodegenerative disease target kynurenine 3-monooxygenase prevents accumulation of neurotoxic metabolites. *Commun. Biol.* **2019**, *2*, 271. [CrossRef] [PubMed]

109. Stone, T.W.; Darlington, L.G. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 609–620. [CrossRef] [PubMed]
110. Nematollahi, A.; Sun, G.; Jayawickrama, G.S.; Church, W.B. Kynurenine Aminotransferase Isozyme Inhibitors: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 946. [CrossRef] [PubMed]
111. Han, Q.; Cai, T.; Tagle, D.A.; Li, J. Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 353–368. [CrossRef] [PubMed]
112. Yoshida, Y.; Fujigaki, H.; Kato, K.; Yamazaki, K.; Fujigaki, S.; Kunisawa, K.; Yamamoto, Y.; Mouri, A.; Oda, A.; Nabeshima, T.; et al. Selective and competitive inhibition of kynurenine aminotransferase 2 by glycyrrhizic acid and its analogues. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10243. [CrossRef]
113. Alberati-Giani, D.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Köhler, C.; Cesura, A.M. Regulation of the kynurenine metabolic pathway by interferon-gamma in murine cloned macrophages and microglial cells. *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 996–1004. [CrossRef] [PubMed]
114. Heyes, M.P.; Saito, K.; Major, E.O.; Milstien, S.; Markey, S.P.; Vickers, J.H. A mechanism of quinolinic acid formation by brain in inflammatory neurological disease: Attenuation of synthesis from L-tryptophan by 6-chlorotryptophan and 4-chloro-3-hydroxyanthranilate. *Brain* **1993**, *116*, 1425–1450. [CrossRef] [PubMed]
115. Harden, J.L.; Lewis, S.M.; Lish, S.R.; Suárez-Fariñas, M.; Gareau, D.; Lentini, T.; Johnson-Huang, L.M.; Krueger, J.G.; Lowes, M.A. The tryptophan metabolism enzyme L-kynureninase is a novel inflammatory factor in psoriasis and other inflammatory diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *137*, 1830–1840. [CrossRef]
116. Al-Mansoob, M.; Gupta, I.; Stefan Rusyniak, R.; Ouhtit, A. KYNU, a novel potential target that underpins CD44-promoted breast tumour cell invasion. *J. Cell. Mol. Med.* **2021**, *25*, 2309–2314. [CrossRef] [PubMed]
117. Liu, Y.; Feng, X.; Lai, J.; Yi, W.; Yang, J.; Du, T.; Long, X.; Zhang, Y.; Xiao, Y. A novel role of kynureninase in the growth control of breast cancer cells and its relationships with breast cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23*, 6700. [CrossRef]
118. Rojewska, E.; Korostynski, M.; Przewlocki, R.; Przewlocka, B.; Mika, J. Expression profiling of genes modulated by minocycline in a rat model of neuropathic pain. *Mol. Pain* **2014**, *10*, 1744–8069. [CrossRef]
119. Zhou, W.; Dantzer, R.; Budac, D.P.; Walker, A.K.; Mao-Ying, Q.L.; Lee, A.W.; Heijnen, C.J.; Kavelaars, A. Peripheral indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is required for comorbid depression-like behavior but does not contribute to neuropathic pain in mice. *Brain. Behav. Immun.* **2015**, *46*, 147–153. [CrossRef]
120. Resta, F.; Masi, A.; Sili, M.; Laurino, A.; Moroni, F.; Mannaioni, G. Kynurenic acid and zaprinast induce analgesia by modulating HCN channels through GPR35 activation. *Neuropharmacology* **2016**, *108*, 136–143. [CrossRef]
121. Costantino, G. Inhibitors of quinolinic acid synthesis: New weapons in the study of neuroinflammatory diseases. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 841–843. [CrossRef]
122. Varga, N.; Csapó, E.; Majláth, Z.; Ilisz, I.; Krizbai, I.A.; Wilhelm, I.; Knapp, L.; Toldi, J.; Vécsei, L.; Dékány, I. Targeting of the kynurenic acid across the blood–brain barrier by core-shell nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *86*, 67–74. [CrossRef] [PubMed]
123. Szűcs, E.; Stefanucci, A.; Dimmito, M.P.; Zádor, F.; Pieretti, S.; Zengin, G.; Vécsei, L.; Benyhe, S.; Nalli, M.; Mollica, A. Discovery of Kynurenines Containing Oligopeptides as Potent Opioid Receptor Agonists. *Biomolecules* **2020**, *10*, 284. [CrossRef] [PubMed]
124. Tanaka, M.; Török, N.; Vécsei, L. Are 5-HT $_1$ receptor agonists effective anti-migraine drugs? *Expert Opin. Pharmacother.* **2021**, *22*, 1221–1225. [CrossRef] [PubMed]
125. Negro, A.; Martelletti, P. Novel synthetic treatment options for migraine. *Expert Opin. Pharmacother.* **2021**, *22*, 907–922. [CrossRef] [PubMed]
126. Staats Pires, A.; Tan, V.X.; Heng, B.; Guillemin, G.J.; Latini, A. Kynurenine and Tetrahydrobiopterin Pathways Crosstalk in Pain Hypersensitivity. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 620. [CrossRef]

4.2. Zbadanie wpływu farmakologicznej modulacji szlaku kynureninowego na nadwrażliwość oraz przeciwbólowe efekty leków opioidowych w mysim modelu bólu neuropatycznego – *praca oryginalna* Ciapała i wsp., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023

Szlak kynureninowy odgrywa istotną rolę w patofizjologii wielu zaburzeń układu nerwowego[59,60]. Główne źródło neuroaktywnych kynurenin – kwasu chinolinowego i kwasu kynureninowego – stanowią komórki glejowe, a ponieważ w przebiegu neuropatii dochodzi do ich aktywacji, przypuszcza się, że te metabolity mogą uczestniczyć w mechanizmach powstawania i utrzymywania się bólu neuropatycznego[33,46], jednak zagadnienie to pozostaje nadal słabo poznane. Celem niniejszej pracy stała się zatem analiza zmian ekspresji enzymów szlaku kynureninowego w rdzeniu kręgowym myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego, a także weryfikacja, czy farmakologiczna modulacja tego szlaku wpływa na nadwrażliwość oraz na działanie przeciwbólowe leków opioidowych, których efektywność spada w neuropatii[189]. Zaobserwowaliśmy, że uszkodzenie nerwu kulszowego prowadzi do aktywacji mikrogleju i makrofagów, a w konsekwencji do istotnego wzrostu ekspresji mRNA genów kodujących enzymy: *Kmo*, kynureninazę (*Kynu*) oraz oksydazę 3-hydroksyantranilinową (*Haoo*) w rdzeniu kręgowym, a enzymy te ukierunkowują szlak na produkcję neurotoksycznego metabolitu, kwasu chinolinowego (**Rycina 5**), Wykazaliśmy, że wyciszenie aktywacji, infiltracji lub proliferacji mikrogleju/makrofagów poprzez podanie minocykliny oraz jednoczesne podanie L-kynureniny, która jest centralnym metabolitem szlaku, skuteczniej obniża nadwrażliwość na bodziec dotykowy. Co ważne, nasze eksperymenty behawioralne wykazały również po raz pierwszy, że nie tylko podpajęczynówkowe podanie L-kynureniny, ale również selektywnego inhibitora enzymu KMO - UPF648 zmniejsza nadwrażliwość dotykową i termiczną u myszy po uszkodzeniu nerwu. Dodatkowo dowiedliśmy, że podanie podpajęczynówkowe UPF648 przed L-kynureniną powoduje jeszcze efektywniejsze hamowanie nadwrażliwości dotykowej i termicznej w zastosowanym modelu bólu neuropatycznego. Co szczególnie istotne, łączne podanie tych substancji z lekami opioidowymi (morfiną, buprenorfiną i/lub oksykodonem) efektywniej uśmierza nadwrażliwość.



***Rycina 5**. Przebieg szlaku kynureninowego w komórkach glejowych oraz zmiany ekspresji mRNA jego enzymów w rdzeniu kręgowym myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego wraz z zaznaczonymi punktami uchwytu farmakologicznej modulacji – opracowano na podstawie literatury[61], zmodyfikowano zgodnie z uzyskanymi wynikami. **Legenda:** ↑-wzrost, ↓-spadek, –brak zmian, ⊤-inhibitor.*

Podsumowując, po raz pierwszy wykazaliśmy, że nie tylko zahamowanie aktywacji mikrogleju/makrofagów oraz zablokowanie enzymu KMO, ale również podanie centralnego metabolitu szlaku kynureninowego - L-kynureniny, może zwiększać skuteczność leków opioidowych w neuropatii. Wyniki te wskazują, że ingerencja w poszczególne etapy szlaku kynureninowego może stanowić wyjątkowo obiecującą strategię terapeutyczną, otwierającą nowe możliwości w projektowaniu skuteczniejszych metod uśmierzania bólu neuropatycznego.

Toxicology and Applied Pharmacology 461 (2023) 116382

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/taap

Effect of pharmacological modulation of the kynurenine pathway on pain-related behavior and opioid analgesia in a mouse model of neuropathic pain

Katarzyna Ciapała, Katarzyna Pawlik, Agata Ciechanowska, Joanna Mika, Ewelina Rojewska *

Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Department of Pain Pharmacology, Krakow, Poland

ARTICLE INFO

Editor: Lawrence Lash

Keywords:
Kynurenine pathway
L-kynurenine
Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)
Kynurenine 3-monooxygenase (KMO)
Neuropathic pain
Opioids

ABSTRACT

Dysfunction of the central nervous system are accompanied by changes in tryptophan metabolism, with the kynurenine pathway (KP) being the main route of its catabolism. Recently, KP metabolites, which are collectively called kynurenines, have become an area of intense research due to their ability to directly and indirectly affect a variety of classic neurotransmitter systems. However, the significance of KP in neuropathic pain is still poorly understood. Therefore, we designed several experiments to verify changes in the mRNA levels of KP enzymes in parallel with other factors related to this metabolic route after chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI model) in mice. The analysis revealed an increase in, *Kmo*, *Kynu and Haoo* mRNA levels in the spinal cord on the 7th day after CCI, while *Kat1, Kat2, Tdo2, Ido2* and *Qprt* mRNA levels remain unchanged. Subsequent pharmacological studies provided evidence that modulation of KP by single intrathecal administration of 1-D-MT, UPF468 or L-kynurenine attenuates mechanical and thermal hypersensitivity and increases the effectiveness of selected opioids in mice as measured on day 7 after CCI. Moreover, our results provide the first evidence that the injection of L-kynurenine preceded by UPF468 (KMO inhibitor) is more effective at reducing hypersensitivity in animals with neuropathic pain. Importantly, L-kynurenine also exerts an analgesic effect after intravenous injections, which is enhanced by the administration of minocycline, an inhibitor of microglial activation. Additionally, L-kynurenine administered intrathecally and intravenously enhances analgesia evoked by all tested opioids (morphine, buprenorphine and oxycodone). Overall, our results indicate that the modulation of KP at different levels might be a new pharmacological tool in neuropathy management.

1. Introduction

According to the International Association for the Study of Pain (IASP), neuropathic pain is a clinical manifestation that accompanies evident central or peripheral nervous system lesions or diseases that meet the specific diagnostic criteria. Chronic pain affects approximately 6–10% of the general population, and conventional analgesics that are used to treat this pathology produce remarkable side effects (van Hecke et al., 2014). Moreover, a significant reduction in pain is achieved in only 50% of patients (Butera, 2007; Colloca et al., 2017), indicating that neuropathic pain therapy requires a more complex approach and the search for new analgesics.

Although the role of the peripheral kynurenine pathway (KP) in tryptophan (TRP) metabolism has been known for several years, researchers have recently recognized that kynurenines within the central nervous system (CNS) have significant physiological consequences

Abbreviations: 1-M-d-T, 1-Methyl-D-tryptophan; 3-HAA/3-HANA, 3-hydroxyanthranilic acid; 3-HAOO, 3-hydroxyanthranilic oxidase; 3-HK, 3-hydroxy-L-kynurenine; 3-HK-3, hydroxykinurenine; AhR, aryl hydrocarbon receptor; AUC, area under the curve; CCI, chronic constriction injury; CNS, central nervous system; GPR35, G-protein coupled receptor 35; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase,; *i.t.*, intrathecal injections; *i.v.*, intravenous injection; IASP, The International Association for the Study of Pain; IBA-1, allograft inflammatory factor 1; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; IFN-γ, interferon gamma; IL-1β, interleukin 1 beta; IL-6, interleukin-6; KATs, kynurenine aminotransferases; KMO, kynurenine-3-monooxygenase; KP, kynurenine pathway; KYNA, kynurenic acid; KYNU, kynureninase; L-KYN, L-kynurenine; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; NOS2, Nitric oxide synthase 2; QPRT, quinolinic acid phosphoribosyltransferase; QUIN, quinolinic acid; SC, spinal cord; SNI, sciatic nerve injury; TDO, tryptophan 2,3-dioxygenase; TRP, tryptophan; UPF648, (1*S*,2*S*)-2-(3,4-Dichlorobenzoyl)cyclopropanecarboxylic acid; δ- (DOR), delta-opioid receptor; κ- (KOR), kappa-opioid receptor,; μ- (MOR), mu-opioid receptor.

* Corresponding author at: Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Department of Pain Pharmacology, 12 Smętna Str., 31-343 Krakow, Poland.
E-mail address: rojewska@if-pan.krakow.pl (E. Rojewska).

https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116382
Received 1 May 2022; Received in revised form 26 October 2022; Accepted 14 January 2023
Available online 18 January 2023
0041-008X/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

(Schwarcz and Stone, 2017). KP plays an important role in the pathogenesis of many autoimmune and neurodegenerative disorders (Savitz, 2020; Schwarcz and Stone, 2017); however, its involvement in nociception is poorly understood and requires further research. Fejes and colleagues (Fejes et al., 2011) described an important role of kynurenines in migraine, whereas studies conducted by the Mecs group (Mecs et al., 2009) suggested their contribution to inflammatory pain evoked by carrageenan. Based on our previous studies (Rojewska et al., 2019; Rojewska et al., 2018a; Rojewska et al., 2016), we hypothesize that an imbalance between the neurotoxic and neuroprotective metabolites of KP exists in neuropathic pain, which is additionally accompanied by changes in the activity of immune cells responsible for CNS homeostasis. Consequently, inhibition of the activity of selected KP enzymes might attenuate neuropathic pain development.

As shown in our previous study of rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, mRNA levels of *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO), *kynurenine-3-monooxygenase* (KMO) and *3-hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase* (HAOO) are increased on day 7. Additionally, we observed the attenuation of pain-related behavior using repeated administrations of two substances: 1-methyl-D-tryptophan (1-D-MT; IDO inhibitor) and (1*S*,2*S*)-2-(3,4-dichlorobenzoyl)cyclopropanecarboxylic acid (UPF648; KMO inhibitor) (Rojewska et al., 2018a). The first compound targets IDO, an initial enzyme of the KP pathway that is upregulated i.a. by interferon gamma (IFN-γ) and leads to the formation of the main KP metabolite - L-kynurenine (L-KYN), which undergoes three different transformations to 3-hydroxy-L-kynurenine (3−HK) with the participation of KMO (Németh et al., 2005). A further consequence of KMO activity is an increase in the levels of quinolinic acid (QUIN), a selective, endogenous *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor agonist involved in neuropathy development (Collins et al., 2010; Deng et al., 2019; Guillemin, 2012). Cells responsible for the synthesis of QUIN within the CNS are proposed to be microglia/macrophages, which become activated in various neuroimmunological diseases, including neuropathy (Ciapała et al., 2021; Guillemin, 2012; Rojewska et al., 2016). Apart from QUIN, L-KYN can also be converted into kynurenic acid (KYNA) by kynurenine aminotransferases 1 and 2 (KAT 1 and 2), and this metabolite has been typically described as an inhibitory compound with anticonvulsant and antiexcitotoxic properties (Urenjak and Obrenovitch, 2000; Vamos et al., 2009). Additionally, KYNA has been shown to function as an agonist of G protein-coupled receptor 35 (GPR35), which might modulate nociception by reducing Ca^{2+} mobilization (Wang et al., 2006). Moreover, L-KYN itself was proposed to be an aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonist, but its downstream effect is currently unknown (Opitz et al., 2011b).

As the involvement of KP in neuropathic pain pathogenesis and maintenance is still poorly understood, the purpose of this study was to assess the mRNA levels of kynurenine pathway enzymes (*Kat1, Kat2, Haoo, Ido1, Ido2, Tdo2, Kmo, Kynu* and *Qprt*), microglia/macrophage activation markers (ionized calcium-binding adapter molecule 1, *Iba-1*), *Gpr35*, *AhR* and *Ifn-γ* in the murine spinal cord on the 7th and 14th days after sciatic nerve injury. Moreover, we studied the dose-dependent effect of single intrathecal (*i.t.*) injections of 1-D-MT, L-KYN and UPF648 on CCI-exposed mice to assess the analgesic effects of pharmacological modulation of kynurenine pathway, assuming that this treatment will alter the balance toward neuroprotective KYNA synthesis. Furthermore, we examined whether each of the mentioned substances affects the analgesic properties of morphine, buprenorphine and oxycodone. We also performed a single *i.t.* coadministation of L-KYN with UPF648 to investigate whether increasing the amount of substrate and simultaneously inhibiting KMO will shift the balance toward the neuroprotective branch of the KP and subsequently result in a reduction in hypersensitivity. Moreover, we administered an intravenous (*i.v.*) injection of L-KYN preceded by the injection of minocycline, an inhibitor of microglial activation, to assess how blocking the activities of these cells affects neuropathic pain symptoms.

2. Materials and methods

2.1. Animals and ethical statement

Albino-Swiss mice (20–22 g, 5–6 weeks old, Charles River, Germany) were housed in cages on a 12-h dark–light cycle. Food and water were provided ad libitum. The procedures were performed according to the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and IASP recommendations. All experiments were approved by the II Local Ethics Committee on Animal Testing at the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences (Krakow, Poland, LKE 333/2017, 267/2020). In addition, efforts were made to minimize the pain and suffering of the animals, and the minimum number of mice was used to obtain statistical significance in accordance with the 3R policy. The total number of animals used for the experiments is 378, the detailed informations about the size of the individual groups are provided in the figures legends.

2.2. Neuropathic pain model

Chronic constriction injury of the sciatic nerve was established to induce neuropathic pain in mice using the method described by Bennet and Xie (Bennett and Xie, 1988). The surgical procedure was conducted under isoflurane anesthesia, as described in our previous papers (Rojewska et al., 2019; Rojewska et al., 2018b). Briefly, an incision was made below the right hipbone of the mouse, and after sciatic nerve exposure, three ligatures with 4/0 silk thread were tied loose around the nerve distal to the sciatic notch with a 1 mm spacing until a short twitch in the respective hind limb was observed. After surgery, all animals developed long-lasting neuropathic pain-related behaviors. The behavioral experiments were conducted on the 7th and 14th days following the CCI surgical procedure.

2.3. Behavioral tests

2.3.1. Von Frey test

Tactile hypersensitivity was measured using calibrated nylon monofilaments of increasing strength (0.6 to 6 g) (Stoelting, Wood Dale, USA) to observe reactions to mechanical stimuli, as described previously (Rojewska et al., 2019). The animals were placed in plastic cages with a wire mesh floor 5–15 min before the experiment, and a von Frey filament was applied to the midplantar surface of the right hind paw until the hind paw was lifted. Both hind paws of naïve animals were tested using the same method.

2.3.2. Cold plate test

Hypersensitivity to thermal stimuli was evaluated using a cold plate analgesia meter (Ugo Basile, Gemonio, Italy) as described previously (Rojewska et al., 2019). The temperature of the cold plate was maintained at 2 °C, and the cutoff latency was 30 s. The mice were placed on the cold plate, and the latency to lift the hind paw, as well as licking, biting, shaking was recorded. Both hind paws of naïve animals were observed simultaneously. In CCI-exposed mice, the injured paw reacted first to the cold stimulus.

2.4. Pharmacological study

2.4.1. Drugs and routes of administration

The following compounds were used in our experiments: L-kynurenine (L-KYN; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1-methyl-D-tryptophan (1-D-MT; Tocris, Bristol, UK), (1*S*,2*S*)-2-(3,4-dichlorobenzoyl) cyclopropanecarboxylic acid (UPF648; Tocris, Bristol, UK), minocycline (MC; Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA), morphine hydrochloride (M; Fagron, Krakow, Poland), buprenorphine (B; Polfa S.A., Warsaw, Poland) and oxycodone hydrochloride (O; Molteni Farmaceutici, Scandicci, Italy). These substances were administered via intrathecal (*i.t.*)

and/or intravenous (*i.v.*) injection. 1-D-MT and UPF648 were administered only by *i.t.* injection because these inhibitors lack blood-brain barrier (BBB) permeability.

The intrathecal injections were performed to non-anesthetized mice in the lumbar segment of the spinal cord (between the L5 and L6 vertebrae) with a volume of 5 µl, and the tail reflex was an indicator of proper administration, which is consistent with instructions previously described (Fairbanks, 2003). Intravenous injections were performed under isoflurane anesthesia according to available protocols (Shimizu, 2004; Turner et al., 2011). Before administration, the tail was immersed in 40 °C water for 20 s to induce adequate dilatation of the lateral tail veins. After delicate stretching of the tail, the 27G needle was inserted parallel to the tail vein, and substances were slowly applied in a volume of 60 µl.

2.4.2. Dose dependency study

1-D-MT was dissolved in 50% DMSO (dissolved in water for injection) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) and administered *i.t.* at doses of 5, 10 and 20 µg/5 µl on day 7 after CCI. Similarly, UPF648 was dissolved in 50% DMSO and administered *i.t.* at doses of 5, 10 and 20 µg/5 µl on day 7 after CCI. The vehicle-treated CCI-exposed mice received 50% DMSO according to the fixed schedule. L-KYN was dissolved in water for injections and administered *i.t.* at doses of 20, 40 and 80 µg/5 µl on day 7 after surgery. The vehicle-treated CCI-exposed mice received water for injection as scheduled. Behavioral tests were performed 0.5, 3, 5 and 24 h after the injection of each drug. Additionally, L-KYN was also administered *i.v.* at doses of 10, 50 and 150 mg/kg on the 14th day after CCI.

2.4.3. Coadministration with opioids

On day 7 after CCI, single *i.t.* injections of 1-D-MT (10 µg/5 µl), UPF648 (10 µg/5 µl) and L-KYN (40 µg/5 µl) were administered. Then, after 3 h, the vehicle-treated and 1-D-MT/UPF648/L-KYN-treated mice received a single *i.t.* injection of morphine (2.5 µg/5 µl), buprenorphine (1 µg/5 µl) or oxycodone (1 µg/5 µl). Behavioral tests were conducted 0.5 h after opioid injections. On Day 7 after CCI, a single *i.v.* injection of L-KYN (50 mg/kg) was administered. Then, after 3 h, the vehicle-treated and L-KYN-treated mice received a single *i.t.* injection of morphine (5 mg/kg), buprenorphine (5 mg/kg) or oxycodone (5 mg/kg). Behavioral tests were conducted 0.5 h after opioid injections. 1-D-MT and UPF648 were dissolved in 50% DMSO (dissolved in water for injection) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). The vehicle-treated CCI-exposed mice received 50% DMSO according to the same schedule. L-KYN and opioids were dissolved in water for injections and the vehicle-treated CCI-exposed mice received also water for injection as per schedule.

2.4.4. Coadministration of L-kynurenine with UPF648

On day 7 after CCI, a single *i.t.* administration of UPF648 at a dose of 10 µg/5 µl was administered. Next, after 0.5 h, V-treated and UPF648-treated mice received a single *i.t.* injection of L-KYN (40 µg/5 µl), and behavioral tests were conducted 2.5 h after this injection. UPF648 was dissolved in 50% DMSO (dissolved in water for injection) and L-KYN was dissolved in water for injections. The vehicle-treated CCI-exposed mice received suitable solvents.

2.4.5. Coadministration of L-kynurenine with minocycline

A single *i.v.* injection of MC at a dose of 30 mg/kg was administered on day 14 after surgery. Then, after 0.5 h, V-treated and MC-treated mice received a single *i.v.* injection of L-KYN at a dose of 50 mg/kg, and behavioral tests were conducted 1.5, 3, 5 and 24 h after L-KYN administration. L-kynurenine and minocycline were dissolved in water for injections. The vehicle-treated CCI-exposed mice received also water for injection according to the same schedule.

2.5. Analysis of gene expression (RT–qPCR)

Tissue from the ipsilateral fragments of the lumbar (L4-L6) spinal cord were collected from naive and CCI-exposed mice immediately after decapitation on days 7 and 14 after surgery for quantitative real-time PCR (RT–qPCR) analysis. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to a previously described protocol (Chomczynski and Sacchi, 2006). The quality and concentration of RNA were measured using a DeNovix DS-11 spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, USA). The Omniscript RT Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), oligo (dT16) primer (Qiagen Inc., Hilden, Germany) and RNase inhibitor (rRNasin, Promega, Mannheim, Germany) were used for reverse transcription of 1 µg of total RNA. The acquired cDNA templates were diluted 1:10 with RNase-/DNase-free water. RT–qPCR was performed with ~50 ng of cDNAs from each sample using Assay-On-Demand TaqMan probes (Applied Biosystems, Foster City, USA) and an iCycler device (Bio-Rad, Hercules, Warsaw, Poland). The following TaqMan primers were used: Mm00479862_g1 (*Iba-1*), Mm00549584_m1 (cysteine conjugate-beta lyase cytoplasmic, *Kat1*), Mm00496169_m1 (aminoadipate aminotransferase, *Kat2*) Mm00517945_m1 (*Haoo*), Mm00451269_m1 (*Tdo2*), Mm00492590_m1 (*Ido1*), Mm00524210_m1 (*Ido2*), Mm01321343_m1 (*Kmo*), Mm00551012_m1 (*Kynu*), Mm00504998_g1 (quinolinate phosphoribosyltransferase, *Qprt*), Mm01168134_m1 (*Ifn-γ*), Mm00478932_m1 (*Ahr*), Mm01973686_s1 (*Gpr35*) and Mm03024075_m1 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, *Hprt*). As described in our previous study (Rojewska et al., 2018b), *Hprt* was used as an endogenous control and an adequate housekeeping gene. It did not exhibit any significant changes across groups.

2.6. Data analysis

The behavioral data (Figs. 1A, B and 2-7) are presented as the mean grams or seconds ± SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the experimental results, followed by Bonferroni's post hoc test of selected pairs measured separately at each time point. Additionally, the results were evaluated using two-way ANOVA to determine the time × drug interaction, if applicable (Figs. 2, 3, 4, 5 and 7). The biochemical data (Fig. 1C-O) are presented as fold changes relative to the controls (naive animals) ± SEM, which represents the normalized average derived from the threshold cycle value. Additionally, for the data in Fig. 7, the area under the curve (AUC) was calculated. The results were evaluated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons post hoc test. All graphs were generated and statistical analyses were performed using Prism 9 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), and p values <0.05 indicated significant differences between groups.

3. Results

3.1. Changes in Iba-1, Kat1, Kat2, Ido1, Ido2, Tdo2, Kmo, Kynu, Haoo, Qprt, Ifn-γ, AhR and Gpr35 mRNA levels in the spinal cord 7 and 14 days after CCI

Ligation of the sciatic nerve caused the development of symptoms indicating neuropathic pain. All examined mice exhibited strong tactile ($F_{(2,27)} = 285.10$; $p < 0.0001$) (Fig. 1A) and thermal ($F_{(2,27)} = 506.60$; $p < 0.0001$; Fig. 1B) hypersensitivity compared to the control (naive) group at 7 and 14 days after CCI. In parallel, the mRNA levels of *Iba-1* ($F_{(2,18)} = 19.87$; $p < 0.0001$; Fig. 1C), *Ifn-γ* ($F_{(2,16)} = 4.21$; $p = 0.00341$; Fig. 1M) and *Gpr35* ($F_{(2,18)} = 6.16$; $p = 0.0092$; Fig. 1O) were significantly increased in the spinal cord on both the 7th and 14th days after CCI. RT–qPCR analysis also revealed elevated mRNA levels of *Kmo* ($F_{(2,18)} = 7.55$; $p = 0.0042$; Fig. 1I) and *Kynu* ($F_{(2,18)} = 4.51$; $p = 0.0259$; Fig. 1J) on day 7 after CCI. According to the Bonferroni post hoc test, the *Haoo* mRNA level was also upregulated (Fig. 1K) on day 7 after CCI.

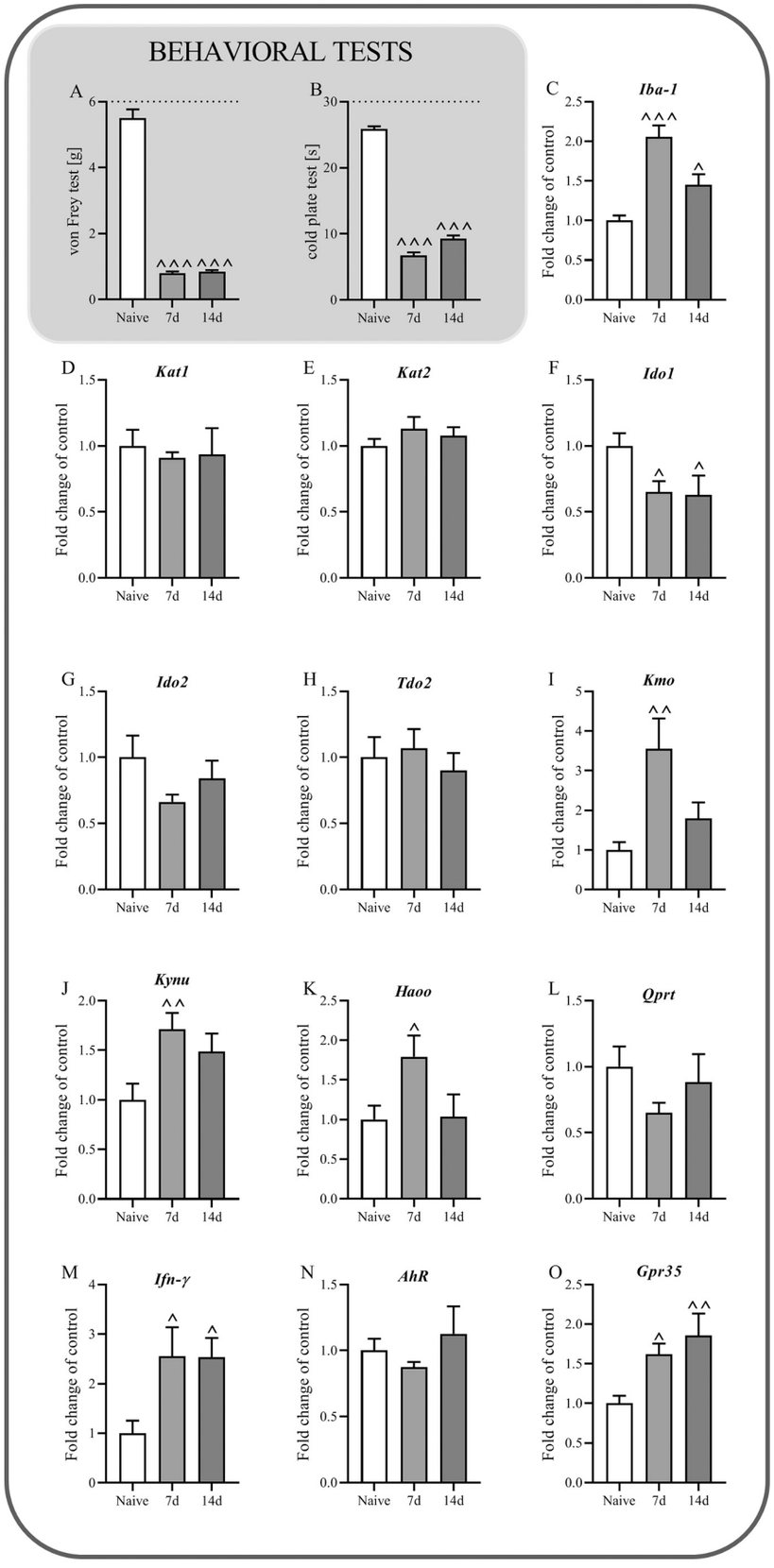


Fig. 1. The levels of mechanical (A; von Frey test) and thermal (B; cold plate test) hypersensitivity measured on the 7th and 14th days after chronic constriction injury (CCI) in mice. The data are presented as the means ± SEM. The number of animals per group: Naive $n = 7$; 7d n = 7; 14d $n = 10$. Intergroup differences were analyzed using Bonferroni's multiple comparison tests. ^^^$p < 0.001$ indicates a significant difference compared with naive animals. RT–qPCR analysis of the *Iba-1* (C), *Kat1* (D), *Kat2* (E), *Ido1* (F), *Ido2* (G), *Tdo2* (H), *Kmo* (I), *Kynu* (J), *Haoo* (K), *Qprt* (L) *Ifn-γ* (M), *Ahr* (N), and *Gpr35* (O) mRNA levels in the ipsilateral spinal cord (L4–L6) on days 7 and 14 after CCI in mice. The data are presented as the mean fold changes in expression relative to the control (naive) levels ± SEM. The number of animals per group Naive $n = 6$–9; 7d n = 6–7; 14d $n = 5$–7. Intergroup differences were analyzed using Bonferroni's test for multiple comparisons. ^$p < 0.05$, ^^$p < 0.01$, and ^^^$p < 0.001$ indicate significant differences compared to the naive group. The dotted line indicates the cutoff value for the behavioral tests.

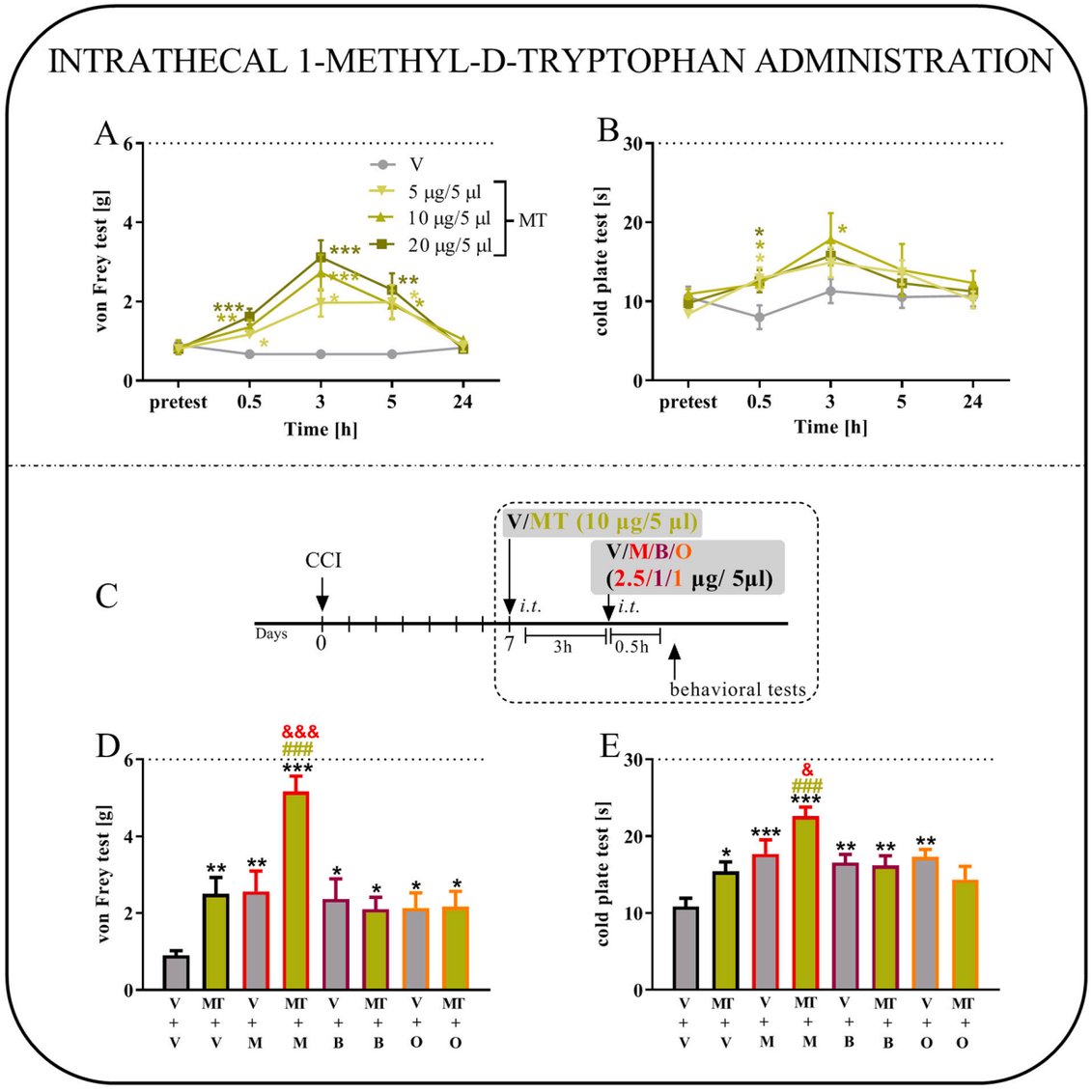


Fig. 2. The effect of single intrathecal 1-methyl-D-tryptophan (MT) injection at doses of 5, 10 and 20 µg/5 µl on mechanical (A, von Frey test) and thermal (B, cold plate test) hypersensitivity was assessed at 0.5, 3, 5 and 24 h after treatment on the 7th day post-CCI. The data are presented as the means ± SEM (6 animals per group). The horizontal dotted line shows the cutoff values. The intergroup differences were analyzed using ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test. *$p <$ 0.05, **$p <$ 0.01 and ***$p <$ 0.001 indicate differences between V-treated CCI-exposed mice and MT-treated CCI-exposed mice. After 3 h, the single V- and MT-treated (20 µg/5 µl) mice received a single dose of V, morphine (2.5 µg/5 µl), buprenorphine (1 µg/5 µl) or oxycodone (1 µg/5 µl), and behavioral tests were conducted 30 min later (C, D, E). The data are presented as the means ± SEM. The number of animals per group V + V n = 6; MT + V n = 6; V + M n = 5–6; MT + M n = 6; V + B n = 6; MT + B n = 6; V + O n = 5–6; MT + O n = 6. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons post hoc test. *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001 indicate differences compared with V + V-treated CCI-exposed mice; &p < 0.05 and &&&p < 0.001 indicate differences between the V + M/B/O- and MT + M/B/O-treated CCI-exposed mice; and ###p < 0.001 indicates differences between the MT + V- and MT + M/B/O-treated CCI-exposed mice. **Abbreviations: B**, buprenorphine; **CCI**, chronic constriction injury; **M**, morphine; **MT,** 1-methyl-D-tryptophan; **O**, oxycodone **V**, vehicle.

Interestingly, the *Ido1* mRNA level was decreased at both time points after surgery ($F_{(2,18)} = 3.48$; $p < 0.0528$; Fig. 1F). Any changes in the mRNA levels of *Kat1, Kat2, Tdo2, Ido2, Qprt* and *AhR* were observed (Fig. 1D, E, H, G, L, N).

3.2. The effect of a single i.t. administration of 1-D-MT on pain-related behaviors and opioid effectiveness on the 7th day after CCI

A single *i.t.* injection of 1-D-MT dose-dependently diminished tactile hypersensitivity measured using the von Frey test compared to vehicle-treated mice at 0.5, 3 and 5 h after treatment (Fig. 2A). The most effective dose was 20 µg/5 µl, which significantly ($F_{(3,20)} = 8.98$; $p =$ 0.0006) attenuated mechanical hypersensitivity 3 h after injection (Fig. 2A). Two-way ANOVA confirmed a significant interaction ($F_{(12,100)}$ = 3.80; $p <$ 0.0001) between the investigated treatment and the analyzed time points. Regarding the cold plate test, each dose of 1-D-MT caused a similar analgesic effect 0.5 h after administration ($F_{(3,20)} =$ 3.21; $p = 0.0451$) (Fig. 2B). In the cold plate test, two-way ANOVA did not show a time × drug interaction ($F_{(12,100)} = 0.80$; $p = 0.6493$). A reduction in mechanical hypersensitivity was no longer observed after 24 h, while the decrease in thermal hypersensitivity persisted until 0.5 h except for the dose of 10 µg/5 µl, which was still significantly effective 3

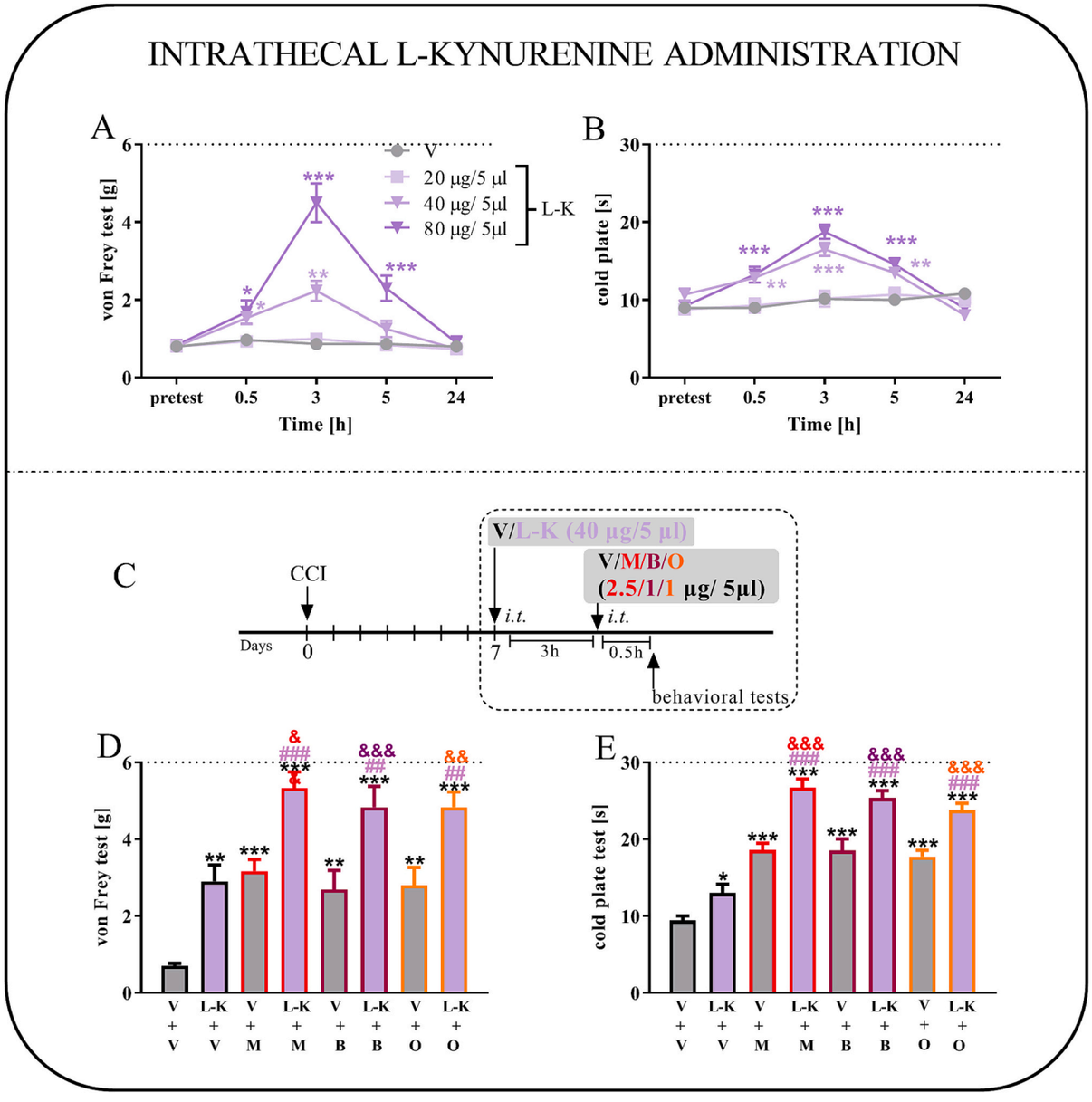


Fig. 3. The effect of a single intrathecal L-kynurenine (L-K) injection at doses of 20, 40 and 80 µg/5 µl on mechanical (A, von Frey test) and thermal (B, cold plate test) hypersensitivity was assessed at 0.5, 3, 5 and 24 h after treatment on the 7th day after CCI. The data are presented as the means ± SEM (5–6 animals per group). The horizontal dotted line shows the cutoff values. The intergroup differences were analyzed using ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ and ***$p < 0.001$ indicate differences between V-treated CCI-exposed mice and L-K-treated CCI-exposed mice. The single intrathecal administration of UPF (10 µg/5 µl) enhanced morphine (2.5 µg/5 µl) and buprenorphine (1 µg/5 µl) but not oxycodone (1 µg/5 µl) effectiveness in CCI-exposed mice, as measured using the von Frey (D) and cold plate (E) tests. After 3 h, the single V- and L-K-treated (40 µg/5 µl) mice received a single dose of V, morphine (2.5 µg/5 µl), buprenorphine (1 µg/5 µl) or oxycodone (1 µg/5 µl), and behavioral tests were conducted 30 min later (C, D, E). The data are presented as the means ± SEM. The number of animals per group V + V n = 6; L-K + V n = 6; V + M n = 5–6; L-K + M n = 6; V + B *n* = 8; L-K + B n = 6; V + O n = 8; L-K + O n = 6. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons post hoc test. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, and ***$p < 0.001$ indicate differences compared with V + V-treated CCI-exposed mice; &$p < 0.05$, &&$p < 0.01$, and &&&$p < 0.001$ indicate differences between the V + M/B/O- and L-K + M/B/O-treated CCI-exposed mice; and ##$p < 0.01$ and ###$p < 0.001$ indicate differences between the L-K + V- and L-K + M/B/O-treated CCI-exposed mice. **Abbreviations: B**, buprenorphine; **CCI**, chronic constriction injury; **L-K**, L-kynurenine; **M**, morphine; **O**, oxycodone; **V**, vehicle.

h after injection.

Intrathecal administration of 1-D-MT at a dose of 10 µg/5 µl significantly attenuated CCI-induced mechanical and thermal hypersensitivity measured using the von Frey ($F_{(7,40)} = 8.68$; $p < 0.0001$) and cold plate ($F_{(7,38)} = 6.64$; $p < 0.0001$) tests, respectively, compared to the vehicle-treated group (Fig. 2D, E). Tactile and thermal hypersensitivity were also reduced after a single *i.t.* injection of morphine (2.5 µg/5 µl), buprenorphine (1 µg/5 µl) or oxycodone (1 µg/5 µl), as measured by the von Frey (Fig. 2D) and cold plate (Fig. 2E) tests. The coadministration of 1-D-MT with opioids resulted in a more effective attenuation of mechanical and thermal hypersensitivity, but only in the case of morphine (Fig. 2D, E).

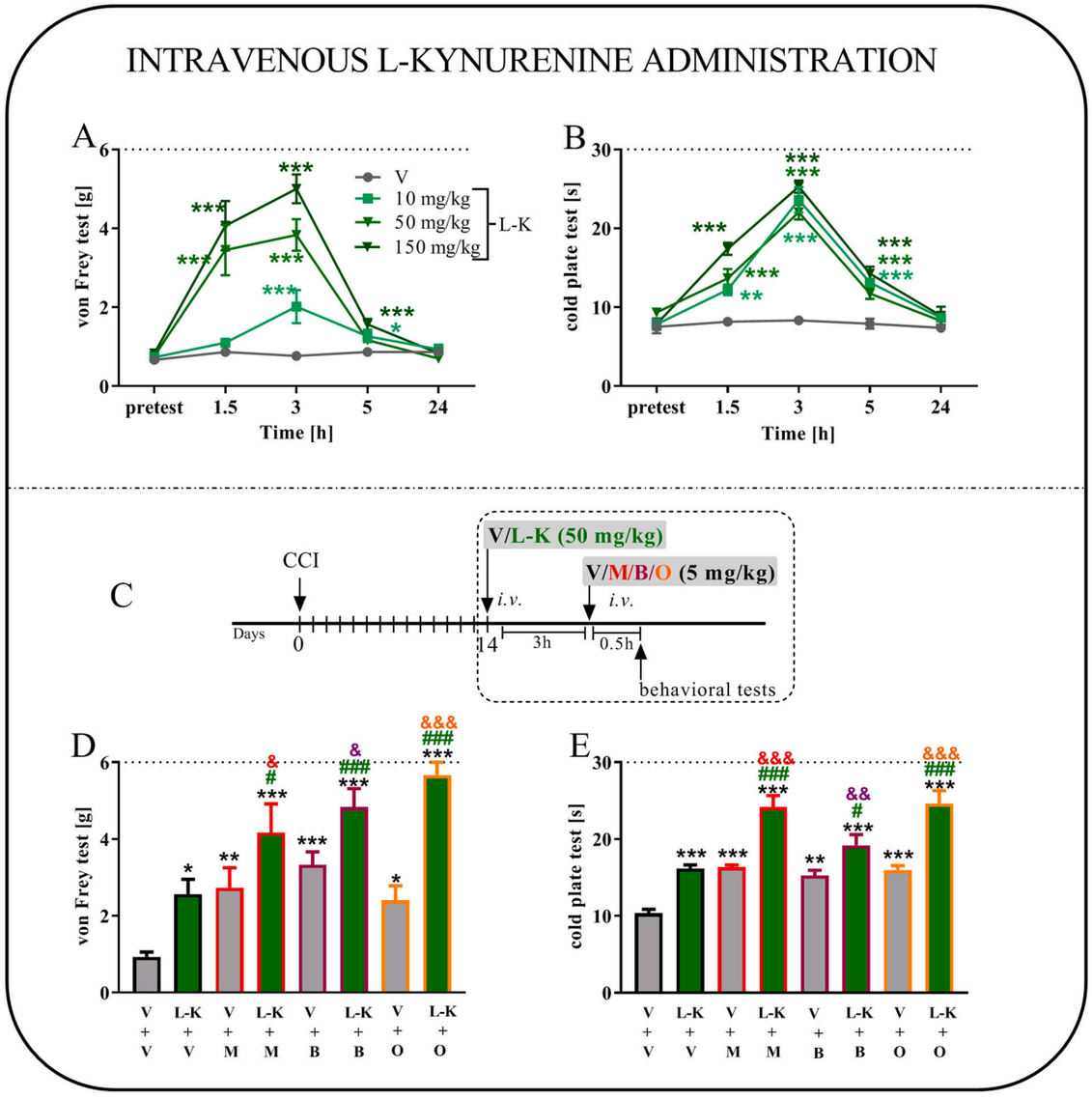


Fig. 4. The effect of a single intravenous L-kynurenine (L-K) injection at doses of 10, 50 and 150 mg/kg on mechanical (A, von Frey test) and thermal (B, cold plate test) hypersensitivity was assessed 1.5, 3, 5 and 24 h after treatment on the 14th day after CCI. The data are presented as the means ± SEM (6 animals per group). The horizontal dotted line shows the cutoff values. The intergroup differences were analyzed using ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test. *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 indicate differences between V-treated CCI-exposed mice and L-K-treated CCI-exposed mice. Additionally, the single V- and L-K-treated (50 mg/kg) mice received a single dose of V, morphine (5 mg/kg), buprenorphine (5 mg/kg) or oxycodone (5 mg/kg) after 3 h, and behavioral tests were conducted 30 min later (C, D, E). The data are presented as the means ± SEM. The number of animals per group V + V n = 5–6; L-K + V n = 6; V + M n = 5–6; L-K + M n = 6; V + B n = 8; L-K + B n = 6; V + O n = 8; L-K + O n = 6. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons post hoc test. *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001 indicate differences compared with V + V-treated CCI-exposed mice; &p < 0.05, &&p < 0.01, and &&&p < 0.001 indicate differences between the V + M/B/O- and L-K + M/B/O-treated CCI-exposed mice; and #p < 0.05, ##p < 0.01, and ###p < 0.001 indicate differences between the L-K + M/B/O-treated CCI-exposed mice. **Abbreviations: B**, buprenorphine; **CCI**, chronic constriction injury; **L-K**, L-kynurenine; **M**, morphine; **O**, oxycodone; **V**, vehicle.

3.3. The effect of a single i.t. administration of L-kynurenine on pain-related behaviors and opioid effectiveness on the 7th day after CCI

L-kynurenine administered *i.t.* dose-dependently attenuated mechanical and thermal hypersensitivity measured using von Frey and cold plate tests, respectively, compared to vehicle-treated mice at 0.5, 3 and 5 h after treatment on day 7 (Fig. 3). According to the von Frey (Fig. 3A) and cold plate (Fig. 3B) test results, the most effective dose that led to the strongest attenuation of tactile ($F_{(3,20)} = 32.73$; $p < 0.0001$) and thermal ($F_{(3,19)} = 24.55$; $p < 0.0001$) hypersensitivity was 80 μg/5 μl at 3 h after injection. In contrast, the lowest dose did not induce an analgesic effect at any time point in any test. Two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the analyzed time points in both the von Frey ($F_{(12,100)} = 13.08$; $p < 0.0001$) and cold plate ($F_{(12,99)} = 8.33$; $p < 0.0001$) tests. The reduction in thermal hypersensitivity was no longer observed after 24 h, while the attenuation of tactile hypersensitivity was observed up to 3 h, except for a dose of 80 μg/5 μl, which was still significantly effective 5 h after the injection.

Intrathecal administration of L-KYN at a dose of 40 μg/5 μl significantly attenuated CCI-induced mechanical and thermal hypersensitivity measured using the von Frey ($F_{(7,44)} = 11.64$; $p < 0.0001$) and cold plate ($F_{(7,44)} = 28.75$; $p < 0.0001$) tests, respectively, compared to the vehicle-

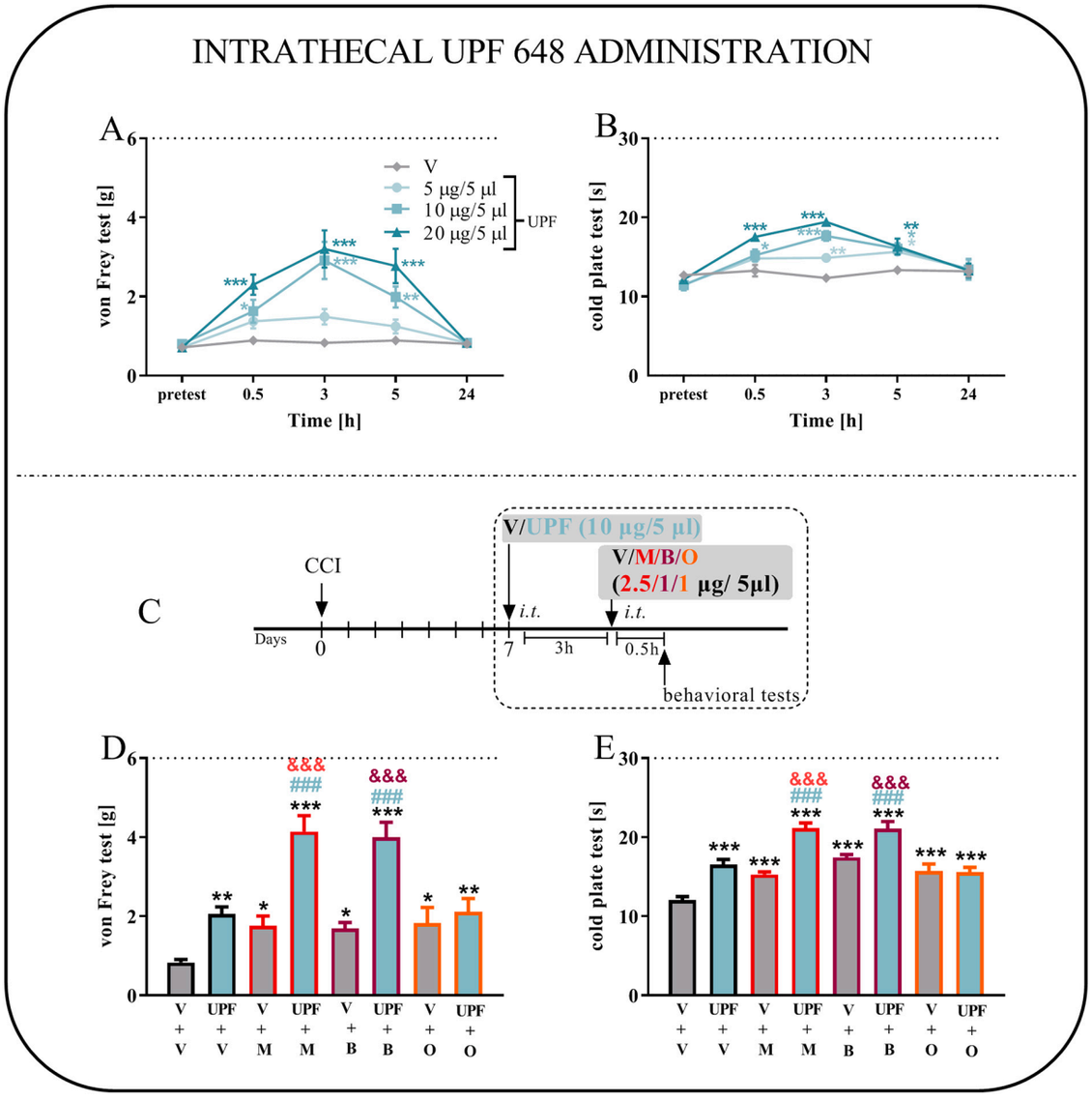


Fig. 5. The effect of a single intrathecal UPF648 (UPF) injection at doses of 5, 10 and 20 µg/5 µl on mechanical (A, von Frey test) and thermal (B, cold plate test) hypersensitivity was assessed 0.5, 3, 5 and 24 h after treatment on the 7th day after CCI. The data are presented as the means ± SEM (5–7 animals per group). The horizontal dotted line shows the cutoff values. The intergroup differences were analyzed using ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ and ***$p < 0.001$ indicate differences between V-treated CCI-exposed mice and UPF-treated CCI-exposed mice. The single V- and UPF-treated (10 µg/5 µl) mice were administered a single dose of V, morphine (2.5 µg/5 µl), buprenorphine (1 µg/5 µl) or oxycodone (1 µg/5 µl) after 3 h, and behavioral tests were conducted 30 min later (C, D, E). The data are presented as the means ± SEM. The number of animals per group V + V n = 7; UPF + V n = 7; V + M n = 7; UPF + M n = 7; V + B n = 7; UPF + B n = 7; V + O n = 7; UPF + O *n* = 7. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons post hoc test. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, and ***$p < 0.001$ indicate differences compared with V + V-treated CCI-exposed mice; &&&$p < 0.001$ indicates differences between the V + M/B/O- and UPF + M/B/O-treated CCI-exposed mice; and ###$p < 0.001$ indicates differences between the UPF + V- and UPF + M/B/O-treated CCI-exposed mice. **Abbreviations: B**, buprenorphine; **CCI**, chronic constriction injury; **M**, morphine; **O**, oxycodone; **UPF**, UPF648; **V**, vehicle.

treated group (Fig. 3D, E). Tactile and thermal hypersensitivity were also reduced after a single *i.t.* injection of morphine (2.5 µg/5 µl), buprenorphine (1 µg/5 µl) or oxycodone (1 µg/5 µl), as measured using the von Frey (Fig. 3D) and cold plate (Fig. 3E) tests. The coadministration of L-KYN with opioids resulted in a more effective attenuation of mechanical and thermal hypersensitivity by each opioid used (Fig. 3D, E).

3.4. The effect of a single i.v. administration of L-kynurenine on pain-related behaviors and opioid effectiveness on the 14th day after CCI

L-kynurenine administered *i.v.* dose-dependently reduced mechanical and thermal hypersensitivity in the von Frey and cold plate tests, respectively, compared to vehicle-treated mice at 1.5, 3 and 5 h after treatment (Fig. 4). According to the results of the von Frey test (Fig. 4A), the most effective dose that led to the strongest attenuation of tactile hypersensitivity ($F_{(3,20)} = 29.70$; $p < 0.0001$) was 150 mg/kg at 3 h after injection. At the same time point in the cold plate test (Fig. 4B), doses of 10, 50 and 150 mg/kg exhibited similar effectiveness in reducing

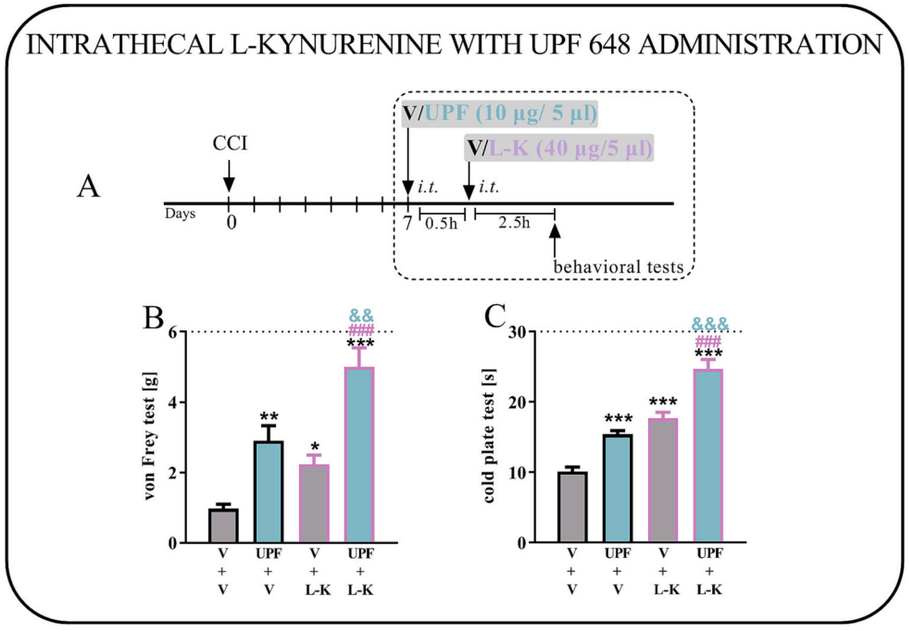


Fig. 6. The effect of coadministration of a single intrathecal L-kynurenine (L-K, 40 µg/5 µl) injection with UPF648 (UPF, 10 µg/5 µl) on mechanical (B, von Frey test) and thermal (C, cold plate test) hypersensitivity on the 7th day after CCI. The single V- and UPF-treated mice were administered a single dose of L-K or V after 0.5 h, and behavioral tests were conducted 2.5 h later (A). The data are presented as the means ± SEM. The number of animals per group V + V n = 6; UPF + V n = 6; V + L-K n = 6; UPF + L-K n = 7. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons post hoc test. *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001 indicate differences compared with V + V-treated CCI-exposed mice; &&p < 0.05 and &&&p < 0.001 indicate differences between the V + L-K- and UPF + L-K-treated CCI-exposed mice; and ###p < 0.001 indicates differences between the UPF + V- and UPF + L-K-treated CCI-exposed mice. **Abbreviations: CCI**, chronic constriction injury; **L-K**, L-kynurenine; **UPF**, UPF648; **V**, vehicle.

thermal hypersensitivity ($F_{(3,20)} = 56.89$; $p < 0.0001$). Two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the analyzed time points in both the von Frey ($F_{(12,100)} = 12.26$; $p < 0.0001$) and cold plate ($F_{(12,100)} = 15.40$; $p < 0.0001$) tests. The hypersensitivity-relieving effects of L-KYN were observed for up to 5 h in both tests. Tactile and thermal hypersensitivity were also reduced after a single *i.v.* injection of morphine (5 mg/kg), buprenorphine (5 mg/kg) or oxycodone (5 mg/kg), as measured using the von Frey (Fig. 4D) and cold plate (Fig. 4E) tests, respectively. The coadministration of L-KYN with opioids resulted in a more effective attenuation of mechanical and thermal hypersensitivity by each opioid used (Fig. 4D, E).

3.5. The effect of a single i.t. administration of UPF648 on pain-related behaviors and opioid effectiveness on the 7th day after CCI

A single *i.t.* injection of UPF648 dose-dependently attenuated tactile and thermal hypersensitivity measured using von Frey and cold plate tests, respectively, compared to vehicle-treated mice at 0.5, 3 and 5 h after treatment (Fig. 5). In both the von Frey and cold plate tests, the most effective dose was 20 µg/5 µl, which significantly diminished mechanical ($F_{(3,24)} = 10.62$; $p = 0.0001$) and thermal ($F_{(3,22)} = 30.75$; $p < 0.0001$) hypersensitivity at 3 h after the injection (Fig. 5A, B). Two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the time points in both the von Frey ($F_{(12,120)} = 5.15$; $p < 0.0001$) and cold plate ($F_{(12,109)} = 4.03$; $p < 0.0001$) tests. Attenuation of mechanical and thermal hypersensitivity was no longer observed 24 h after the injection of UPF648.

Intrathecal administration of UPF648 at a dose of 10 µg/5 µl significantly attenuated CCI-induced mechanical and thermal hypersensitivity measured using von Frey ($F_{(7,48)} = 15.45$; $p < 0.0001$) and cold plate ($F_{(7,48)} = 21.77$; $p < 0.0001$) tests, respectively, compared to the vehicle-treated group (Fig. 5D, E). Tactile and thermal hypersensitivity were also reduced after a single *i.t.* injection of morphine (2.5 µg/5 µl), buprenorphine (1 µg/5 µl) or oxycodone (1 µg/5 µl), as measured by the von Frey (Fig. 5D) and cold plate (Fig. 5E) tests, respectively. The coadministration of UPF648 with opioids resulted in more effective attenuation of mechanical and thermal hypersensitivity by morphine and buprenorphine (Fig. 5D, E).

3.6. The effect of a single i.t. administration of L-kynurenine preceded by the injection of UPF648 on pain-related behaviors on the 7th day after CCI

L-KYN and UPF648 administered alone at doses of 40 µg/5 µl and 10 µg/5 µl, respectively, both attenuated mechanical and thermal hypersensitivity, as measured using von Frey ($F_{(3,22)} = 18.14$; $p < 0.0001$) (Fig. 6B) and cold plate tests ($F_{(3,21)} = 41.38$; $p < 0.0001$), respectively (Fig. 6C). Interestingly, intrathecal administration of L-KYN preceded by an injection of UPF648 (Fig. 6A) reduced both thermal and tactile hypersensitivity to a greater extent than both substances administered alone.

3.7. The effects of a single i.v. administration of L-kynurenine preceded by minocycline injection on pain-related behaviors on the 14th day after CCI

L-KYN administered *i.v.* at a dose of 50 mg/kg reduced tactile and thermal hypersensitivity measured using von Frey and cold plate tests, respectively, at each tested time point (Fig. 7B, C). Similarly, MC administered *i.v.* at a dose of 30 mg/kg attenuated mechanical and thermal hypersensitivity at each tested time point, except 5 h in the von Frey test (Fig. 7B). Two-way ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the time points in both the von Frey ($F_{(12,100)} = 7.40$; $p < 0.0001$) and cold plate ($F_{(12,109)} = 5.49$; $p < 0.0001$) tests. Importantly, the combined *i.v.* administration of L-KYN with MC resulted in enhanced analgesic effects on mice subjected to both the von Frey ($F_{(3,20)} = 16.55$; $p < 0.0001$) and cold plate ($F_{(3,14)} = 15.89$; $p < 0.0001$) tests, as measured 5 h after treatment. An analysis of the AUCs confirmed that the combination of MC with L-KYN injections evoked the best analgesic effect in the von Frey test (Fig. 7D).

4. Discussion

The results of the present study indicate that pharmacological interventions targeting various levels of the KP exerts analgesic effects on a mouse model of neuropathic pain. These experiments clearly show that the intrathecal administration of 1-D-MT, which inhibits KP in the initial state, resulted in the attenuation of mechanical and thermal hypersensitivity and an increase in the effectiveness of morphine, but not buprenorphine or oxycodone on day 7 after CCI. A similar effect on

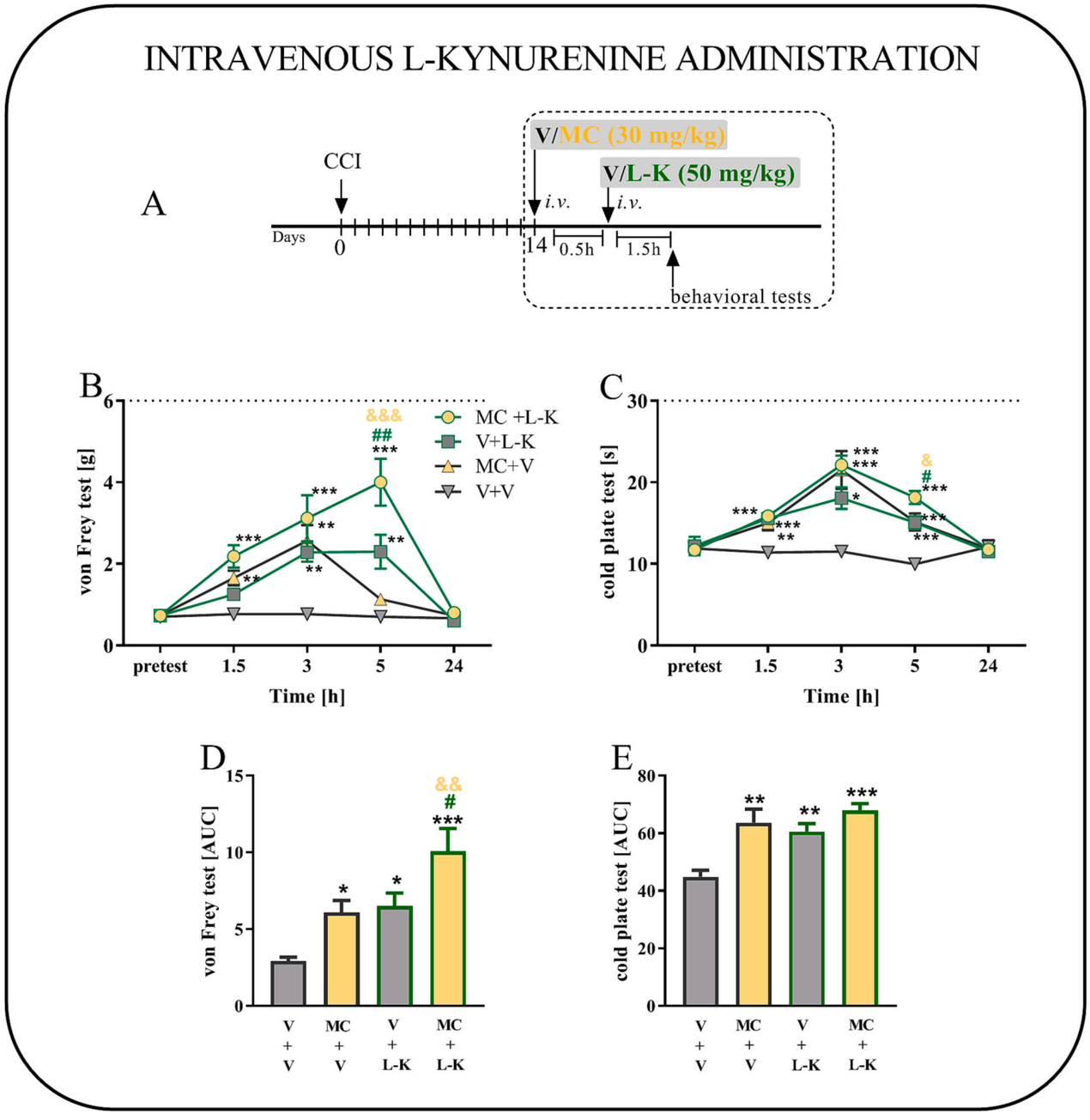


Fig. 7. The effect of a single intravenous injection of minocycline (30 mg/kg) on enhancing L-K (50 mg/kg) effectiveness in CCI-exposed mice, as measured using the von Frey (B) and cold plate (C) tests. At 0.5 h, single V- and MC-treated mice received a single dose of V or L-K, and the behavioral tests were conducted 1.5, 3, 5 and 24 h after the last treatment (A). The data are presented as the means ± SEM (4–6 animals per group). The horizontal dotted line shows the cutoff values. Additionally, the data were analyzed by calculating areas under the curve (AUCs; D, E). The number of animals per group V + V n = 5–6; MC + V n = 5–6; V + L-K *n* = 4–6; MC + L-K n = 4–6. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons post hoc test. *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001 indicate differences compared with V + V-treated CCI-exposed mice; &p < 0.05, &&p < 0.01, and &&&p < 0.001 indicates differences between the MC + V- and MC + L-K-treated CCI-exposed mice; and #p < 0.01 and ##p < 0.05 indicate differences between the V + L-K- and MC + L-K-treated CCI-exposed mice. **Abbreviations: CCI**, chronic constriction injury; **L-K**, L-kynurenine; **UPF**, UPF648; **V**, vehicle; **MC**, minocycline.

nociception was observed after treatment with UPF648, a potent and selective KMO inhibitor. However, its coadministration with opioids revealed that UPF648 potentiated the analgesic effect of morphine and buprenorphine but not oxycodone. Interestingly, L-KYN administered intrathecally and intravenously most effectively diminished hypersensitivity and enhanced analgesia evoked by all tested opioids. To the best of our knowledge, this report is the first to show that the combination of L-KYN with a KMO inhibitor strengthens the analgesic effect on a neuropathic pain model. Similar results were obtained with L-KYN and minocycline, which are inhibitors of microglial activation. Results obtain by us and others indicate that the modulation of the KP at different stages might be a promising new approach to improve

neuropathy management, however further experiments are necessary.

Involvement and disturbance of the KP in the functioning of the CNS, which accompany diseases of various etiologies, have been widely studied in the last few years. L-KYN and its metabolites directly or indirectly affect neurotransmitters and immunomodulators (Badawy and Morgan, 2007; Stone, 1993). Recently, it is considered that metabolism of TRP via KP is involved in the modulation of immune response (Krupa and Kowalska, 2021). It is known that there is a close link between the kynurenine system and nociceptive cytokines such as IFN-α, IFN-γ, TNF-α or IL-4 (Mándi and Vécsei, 2011; Mithaiwala et al., 2021). The immune mediators, such as cytokines (interleukins or chemokines) exert the effect of sensitizing and stimulating nociceptors (Baral et al., 2019; Kwiatkowski et al., 2019; Pawlik et al., 2021). These changes can lead to long-term maladaptive plasticity resulting in persistent neuropathic pain.

Catabolism of TRP begins with its conversion to L-KYN, and this step is controlled by three enzymes: IDO1, IDO2 and TDO. It is established that TDO (also known as TDO2) is expressed in many tumors, including glioma and colorectal, lung and breast cancers (Novikov et al., 2016; Opitz et al., 2011a). Our previous study revealed a decrease in the *Tdo2* mRNA level in the dorsal root ganglia (DRG) on Days 2 and 7 after CCI in rats, while significant changes were not observed in the spinal cord (Rojewska et al., 2018a). Similarly, in the present study, no spinal change in the *Tdo2* mRNA level was detected. Although both TDO and IDO are responsible for the first phase of KP metabolism, their regulation notably differs since TDO is not controlled by proinflammatory cytokines (Yu et al., 2016), which are known to be involved in neuropathy (Hung et al., 2017). IDO1 and 2 are two related, rate-limiting enzymes that share a high level of sequence identity, but they have different functions and kinetics (Kashi et al., 2019). Considering our previous work, where we showed the upregulation of *Ido1* and *Ido2* mRNA levels in the DRG and *Ido2* mRNA levels in the spinal cord 7 days after CCI in rats, we identified IDO as an important mediator of nociception (Rojewska et al., 2018a). The current results confirm that an intrathecal injection of 1-D-MT (IDO inhibitor) contributes to the reduction in hypersensitivity to tactile and thermal stimuli. However, to our surprise, in mice, the RT–qPCR analysis did not show any spinal changes in *Ido2* expression, while *Ido1* mRNA levels were significantly decreased. This finding is undoubtedly interesting, but many studies have reported species differences in the activity of KP and its enzymes (Badawy, 2017). Indeed, no changes in spinal levels of the *Ido1* mRNA were observed after spared nerve injury (SNI) in mice (Zhou et al., 2015), which is consistent with our results. To the best of our knowledge, our research is the first to examine the importance of the KP pathway in opioid analgesia. Importantly, single 1-D-MT not only diminished hypersensitivity but also enhanced the effectiveness of morphine, but not buprenorphine or oxycodone on day 7 after CCI. Undoubtedly, all tested opioids differ in chemical structure, physicochemical properties and pharmacokinetics. Morphine and oxycodone are μ- (MOR), δ- (DOR), and κ- (KOR) opioid receptor agonists, while buprenorphine is an MOR and nociceptin receptor (NOR) agonist and DOR/KOR antagonist. Initially, we were surprised by the observation that 1-D-MT improves the effectiveness of morphine but not oxycodone. However, oxycodone and morphine activate MOR differently in pain-related brain regions (Nakamura et al., 2013). Morphine, oxycodone, and buprenorphine are recommended as third-line treatments, but morphine is mostly known to lose its effectiveness in individuals with neuropathic pain (Rashid et al., 2004). In this context, the intensification of morphine action by 1-D-MT seems particularly interesting. The analgesic effect achieved using 1-D-MT might also be because, apart from IDO blockade, 1-D-MT activates AhR, a transcription factor that is responsible for regulating inflammation (Matheus et al., 2020; Moyer et al., 2017). AhR is expressed in several neural cell types, including neurons, astrocytes and microglial cells, but its role in nociception remains unknown. Importantly, in relation to the tested opioids, buprenorphine may also be a potent AhR agonist, while oxycodone does not activate this receptor (Hassan et al., 2013; Neradugomma et al., 2017). Importantly, Wirthgen et al. recently performed studies using IDO1 knockout mice and suggested that 1-methyltryptophan (a combination of both D and L isoforms) causes an increase in neuroprotective KYNA levels independently of IDO activity (Wirthgen et al., 2020). Future investigations are necessary to evaluate the as yet unknown mechanisms responsible for the influence of 1-D-MT on effectiveness of different opioids. IDO function is also strongly related to IFN-γ, which showed increased expression on days 7 and 14 after CCI. This proinflammatory cytokine is mostly produced by T_{h1}, T_c and NK cells, macrophages and microglia and has been recognized to induce neuropathic pain (Liu et al., 2020). Importantly, IFN-γ not only triggers IDO activity but also downregulates the transcription of the MOR gene in neuronal and immune cells (Kraus et al., 2006). The mentioned dependencies undoubtedly require further research to precisely determine the molecular mechanisms by which 1-D-MT achieves analgesic effects. The consequence of IDO activity is the formation of L-KYN, the main KP metabolite. Our results indicate that L-KYN administered *i.v.* and *i.t.*, not only reduces pain-related behavior in mice with CCI but also enhances the effectiveness of all opioids used. L-KYN was suggested to play an important role in nociception and exert analgesic effects on animal models of acute (Heyliger et al., 1998) and inflammatory (Cosi et al., 2011) pain. In 2013, Pineda-Farias et al. showed that intraperitoneal administration of L-KYN (200 mg/kg) did not influence tactile hypersensitivity in rats exposed to spinal nerve ligation (SNL) (Pineda-Farias et al., 2013). Our study is, however, dissimilar, since apart from using mice and the CCI model, we also studied different L-KYN doses and administration routes. Unfortunately, to our knowledge, detailed research on the mechanisms of action of L-KYN in neuropathic pain is unavailable. Moreover, a serious gap in the knowledge of L-KYN interactions with the opioid system exists. L-KYN was very recently recognized to signal through AhR to modulate the levels of reactive oxygen species (ROS) (Kaiser et al., 2020). The accumulation of L-KYN evokes a shift within the tryptophan metabolic pathway toward neuroprotective KYNA (Wonodi et al., 2011). Each of these mechanisms might be responsible for L-KYN analgesic potency in neuropathic pain, but this hypothesis must be confirmed in further, extended studies. Interestingly, an *i.v.* injection of minocycline before L-KYN administration evoked a greater effect on reducing tactile hypersensitivity than L-KYN or minocycline alone. This result suggests the importance of the interaction between KP and microglia/macrophages in neuropathic pain. The observed effect is probably related to the fact that by inhibiting the activity of these cells, we also decreased KMO activity, as was shown previously (Rojewska et al., 2014), which in turn reduces the level of neurotoxic QUIN.

L-KYN, along with the participation of KAT 1 and 2 enzymes, which remain unchanged during neuropathic pain based on our results, is converted to one of the best-studied KP metabolites, KYNA. This metabolite is important in the context of the pathomechanism of neuropathy. Studies have reported its importance in migraine (Curto et al., 2015; Fejes et al., 2011) and neuropathic pain (Rojewska et al., 2019). KYNA is an NMDA receptor antagonist whose activation is strongly associated with neuropathy (Zhou et al., 2011). Additionally, KYNA mediates anti-inflammatory effects through GPR35 (Wang et al., 2006) or AhR (DiNatale et al., 2010). GPR35 is an interesting target that is important in the development of neuropathic pain since its activation by KYNA modulates nociception by reducing Ca^{2+} mobilization. Temporary changes in cytoplasmic Ca^{2+} level represent a key step for neurotransmitter release and the modulation of cell membrane excitability (Gover et al., 2009). Continuous increase of intracellular Ca^{2+} levels is considered to be one of the reasons for hyper-excitability of neurons under neuropathic pain (Alles and Smith, 2018). The analgesic action of KYNA via GPR35 was also reported to be possible due to modulating hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated) channels (Resta et al., 2016). As shown in our previous research, KYNA diminishes thermal and tactile hypersensitivity and enhances the effectiveness of morphine in mice with neuropathic pain (Rojewska et al., 2019). In

addition to conversion to KYNA, L-KYN also undergoes transformation to 3-HK mediated by KMO. The present results confirmed that KMO inhibition by UPF648, which was proved to decrease both neurotoxic 3-HK and QUIN production (by 77 and 66%, respectively) but also moderately increase neuroprotective KYNA synthesis (by 27%) after an intrastriatal injection (Amori et al., 2009), exerts an analgesic effect. KMO inhibition by JM6 was reported to reduce microglial activation in a mouse model of Huntington's disease (Zwilling et al., 2011). The KMO inhibitor Ro61–8048 displays neuroprotective properties in animal models of cerebral hypoxia (Moroni et al., 2003), Huntington's and Alzheimer's diseases (Chin et al., 2005), and following cerebral ischemia (Cozzi et al., 1999). Our previous experiments in rats and mice confirmed that *Kmo* mRNA levels are upregulated after CCI. Additionally, a biochemical study showed that Ro61–6048 reduced the mRNA expression of microglial activation markers and concurrently decreased the levels of pronociceptive factors such as IL-1β, IL-6 and NOS2 in the spinal cord and/or DRG (Rojewska et al., 2016). Moreover, repeated intraperitoneal injections of minocycline decrease the CCI-evoked *Kmo* upregulation (Rojewska et al., 2014). We also showed that both JM6 and Ro61–8048 diminished the symptoms of neuropathic pain and enhanced the effectiveness of morphine in a neuropathic pain model (Rojewska et al., 2014). The obtained results suggested that KMO inhibition causes a shift in the KP pathway toward the neuroprotective KYNA branch. Our present studies additionally indicate that coadministration of UPF648 with opioids resulted in more effective attenuation of mechanical and thermal hypersensitivity by morphine and buprenorphine, as measured on day 7. One of the reasons for the loss of the effectiveness of opioids in individuals with neuropathic pain is the activation of glial cells (Ferrini et al., 2013; Watkins et al., 2007). Our previous in vivo and in vitro studies have shown that minocycline, an inhibitor of microglial activation, enhances the effectiveness of selective MOR, NOR, and KOR ligands in individuals with neuropathy (Mika et al., 2014; Mika et al., 2007; Popiolek-Barczyk et al., 2014). Therefore, we postulate that UPF648 improves the efficacy of opioids through a similar mechanism; for morphine, the beneficial analgesic effect is probably related to MOR and KOR, and the effect of buprenorphine is related to NOR. However, more research is needed to understand the exact mechanism by which KMO inhibition affects opioid function, especially because the oxycodone analgesic effect was surprisingly not enhanced. Additionally, oxycodone, morphine and buprenorphine have markedly different metabolic pathways, and their active metabolites may also affect analgesia (Kalso, 2007).

Importantly, the present study is the first to show that an injection of UPF648 before L-KYN resulted in a stronger decrease in thermal and tactile hypersensitivity than each of these compounds alone. In all probability, the accumulation of L-KYN with simultaneous inhibition of KMO may lead to an increase in KYNA levels. The direct product of KMO activity is 3-HK, which is then modified into 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA) by KYNU. In the current study, we showed that after CCI, the *Kynu* mRNA is upregulated in the spinal cord. However, our previous experiments performed on rats indicated that the *Kynu* mRNA level was not changed in the spinal cord and DRG at different time points after CCI (Rojewska et al., 2018a). This divergence is likely due to species differences and must be studied in further experiments. The next step in the KP pathway is the formation of QUIN as a result of the action of HAOO (Savitz, 2020). Importantly, in the current study, we showed the upregulation of the *Haoo* mRNA in the spinal cord after CCI, which corresponds well with the results obtained previously in rats (Rojewska et al., 2018a). Similarly, elevated HAOO activity has been previously reported in ischemia (Saito et al., 1993) and Huntington's disease (Schwarcz et al., 1988). Notably, QUIN does not have a high-affinity uptake system for its removal from the synapse; therefore, it acts continuously, resulting in damage and the entry of large amounts of Ca^{2+} into neurons and astrocytes (Lugo-Huitrón et al., 2013). QUIN, which has already been proposed to favor hypersensitivity (Latremoliere et al., 2015), also appears to contribute to neuropathic pain development. The following stage of the KP pathway is the conversion of QUIN to an essential cofactor for cell viability, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD+), with the participation of QPRT, whose mRNA level remains unchanged in neuropathy, based on our results. To date, most of the approaches aimed at reducing neurotoxic QUIN production were based on KMO inhibitors (Costantino, 2014) instead of directly modulating HAOO or KYNU activity. Only a few modulators of KYNU or HAOO have been identified, mostly because the range of chemical tools available for use in these investigations are limited for enzymes. Research on KYNU and HAOO inhibitors, although challenging for chemists, is undoubtedly necessary. These compounds are relatively unexplored, while understanding their roles might contribute to the proposal of a new, alternative method for blocking QUIN production in the future.

5. Conclusions

Taken together, our studies proved that KP is significantly involved in nociception. L-KYN and the KMO inhibitor exert analgesic effects in neuropathic pain as measured on day 7 or 14 after sciatic nerve injury. Most importantly, we showed for the first time that intrathecal administration of 1-D-MT, UPF468 or L-kynurenine potentiated the analgesic properties of morphine, buprenorphine and/or oxycodone. Interestingly, pretreatment with UPF648 or minocycline increased the analgesic properties of L-KYN in mice with CCI. The results presented here indicate that further research on the interdependent mechanisms of KP and the development of neuropathy are necessary. Future experiments should also address important clinical aspects such as influence of KP modulators on early and later stages of neuropathy or effectiveness of their chronic administrations. This knowledge might create the possibility to improve the current therapy or even design new prophylaxes or treatments for neuropathic pain in the future.

Funding

This work was supported by the National Science Centre, Poland (SONATA 2015/17/D/NZ4/02284) and by statutory funds from the Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences, Department of Pain Pharmacology.

Ethical approval

All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures involving animals were performed in accordance with the ethical standards of the International Association for the Study of Pain and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory and approved by the II Local Ethics Committee branch of the National Ethics Committee for Experiments on Animals based at the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland.

Author contribution

Katarzyna Ciapała: writing - original draft, methodology, formal analysis, investigation, visualization, library resources; Katarzyna Pawlik: behavioral test; Agata Ciechanowska: behavioral test; Joanna Mika: writing - review & editing, supervision, funding acquisition; Rojewska Ewelina: conceptualization, funding acquisition, writing - review & editing, supervision, project administration. All authors read and approved the final manuscript.

Declaration of Competing Interest

he authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

References

Alles, S.R.A., Smith, P.A., 2018. Etiology and pharmacology of neuropathic pain. Pharmacol. Rev. 70, 315–347. https://doi.org/10.1124/PR.117.014399.

Amori, L., Guidetti, P., Pellicciari, R., Kajii, Y., Schwarcz, R., 2009. On the relationship between the two branches of the kynurenine pathway in the rat brain in vivo. J. Neurochem. 109, 316–325. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05893.x.

Badawy, A.A.B., 2017. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. Int. J. Tryptophan Res. https://doi.org/10.1177/1178646917691938.

Badawy, A.A.-B., Morgan, C.J., 2007. Tryptophan metabolites as potent inhibitors of aldehyde dehydrogenase activity and potential alcoholism-aversion therapeutic agents. Int. Congr. Ser. 1304, 344–351. https://doi.org/10.1016/J.ICS.2007.07.020.

Baral, P., Udit, S., Chiu, I.M., 2019. Pain and immunity: implications for host defence. Nat. Rev. Immunol. 1 https://doi.org/10.1038/s41577-019-0147-2.

Bennett, G.J., Xie, Y.K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain 33, 87–107.

Butera, J., 2007. Miniperspectives : recent approaches in the treatment of neuropathic pain. J. Med. Chem. 50, 2543–2546.

Chin, J., Palop, J.J., Puoliväli, J., Massaro, C., Bien-Ly, N., Gerstein, H., Scearce-Levie, K., Masliah, E., Mucke, L., 2005. Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. J. Neurosci. 25, 9694–9703. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2980-05.2005.

Chomczynski, P., Sacchi, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat. Protoc. 1, 581–585. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83.

Ciapała, K., Mika, J., Rojewska, E., 2021. The kynurenine pathway as a potential target for neuropathic pain therapy design: from basic research to clinical perspectives. Int. J. Mol. Sci. 22 https://doi.org/10.3390/IJMS222011055.

Collins, S., Sigtermans, M.J., Dahan, A., Zuurmond, W.W.A., Perez, R.S.G.M., 2010. NMDA receptor antagonists for the treatment of neuropathic pain. Pain Med. https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2010.00981.x.

Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A.H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N.B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D. L., Dworkin, R.H., Raja, S.N., 2017. Neuropathic pain. Nat. Rev. Dis. Prim. 3, 17002. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2.

Cosi, C., Mannaioni, G., Cozzi, A., Carlà, V., Sili, M., Cavone, L., Maratea, D., Moroni, F., 2011. G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. Neuropharmacology 60, 1227–1231. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2010.11.014.

Costantino, G., 2014. Inhibitors of quinolinic acid synthesis: new weapons in the study of neuroinflammatory diseases. Future Med. Chem. 6, 841–843. https://doi.org/10.4155/fmc.14.35.

Cozzi, A., Carpenedo, R., Moroni, F., 1999. Kynurenine hydroxylase inhibitors reduce ischemic brain damage: studies with (m-nitrobenzoyl)-alanine (mNBA) and 3,4-dimethoxy-[-N-4- (nitrophenyl)thiazol-2YL]-benzenesulfonamide (Ro 61-8048) in models of focal or global brain ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab. 19, 771–777. https://doi.org/10.1097/00004647-199907000-00007.

Curto, M., Lionetto, L., Negro, A., Capi, M., Fazio, F., Giamberardino, M.A., Simmaco, M., Nicoletti, F., Martelletti, P., 2015. Altered kynurenine pathway metabolites in serum of chronic migraine patients. J. Headache Pain 17, 47. https://doi.org/10.1186/s10194-016-0638-5.

Deng, M., Chen, S.R., Pan, H.L., 2019. Presynaptic NMDA receptors control nociceptive transmission at the spinal cord level in neuropathic pain. Cell. Mol. Life Sci. 76, 1889–1899. https://doi.org/10.1007/S00018-019-03047-Y.

DiNatale, B.C., Murray, I.A., Schroeder, J.C., Flaveny, C.A., Lahoti, T.S., Laurenzana, E. M., Omiecinski, C.J., Perdew, G.H., 2010. Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. Toxicol. Sci. 115, 89–97. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq024.

Fairbanks, C.A., 2003. Spinal delivery of analgesics in experimental models of pain and analgesia. Adv. Drug Deliv. Rev. 55, 1007–1041. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(03)00101-7.

Fejes, A., Pardutz, A., Toldi, J., Vecsei, L., 2011. Kynurenine metabolites and migraine: experimental studies and therapeutic perspectives. Curr. Neuropharmacol. 9, 376–387. https://doi.org/10.2174/157015911795596621.

Ferrini, F., Trang, T., Mattioli, T.A.M., Laffray, S., Del'Guidice, T., Lorenzo, L.E., Castonguay, A., Doyon, N., Zhang, W., Godin, A.G., Mohr, D., Beggs, S., Vandal, K., Beaulieu, J.M., Cahill, C.M., Salter, M.W., De Koninck, Y., 2013. Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal cl-homeostasis. Nat. Neurosci. 16, 183–192. https://doi.org/10.1038/nn.3295.

Gover, T.D., Moreira, T.H., Weinreich, D., 2009. Role of calcium in regulating primary sensory neuronal excitability. Handb. Exp. Pharmacol. 194, 563–587. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79090-7_16/FIGURES/6_16.

Guillemin, G.J., 2012. Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. FEBS J. 279, 1356–1365. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08485.x.

Hassan, H.E., Myers, A.L., Lee, I.J., Mason, C.W., Wang, D., Sinz, M.W., Wang, H., Eddington, N.D., 2013. Induction of xenobiotic receptors, transporters, and drug metabolizing enzymes by oxycodone. Drug Metab. Dispos. 41, 1060–1069. https://doi.org/10.1124/DMD.112.050401.

Heyliger, S.O., Goodman, C.B., Ngong, J.M., Soliman, K.F.A., 1998. The analgesic effects of tryptophan and its metabolites in the rat. Pharmacol. Res. 38, 243–250. https://doi.org/10.1006/phrs.1998.0362.

Hung, A.L., Lim, M., Doshi, T.L., 2017. Targeting cytokines for treatment of neuropathic pain. Scand J Pain 17, 287. https://doi.org/10.1016/J.SJPAIN.2017.08.002.

Kaiser, H., Parker, E., Hamrick, M.W., 2020. Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor: implications for aging and healthspan. Exp. Gerontol. https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110797.

Kalso, E., 2007. How different is oxycodone from morphine? Pain. https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.09.027.

Kashi, A.A., Davis, R.W., Phair, R.D., 2019. The IDO metabolic trap hypothesis for the etiology of ME/CFS. Diagnostics 9, 82. https://doi.org/10.3390/diagnostics9030082.

Kraus, J., Börner, C., Lendeckel, U., Höllt, V., 2006. Interferon-γ down-regulates transcription of the μ-opioid receptor gene in neuronal and immune cells. J. Neuroimmunol. 181, 13–18. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.07.012.

Krupa, A., Kowalska, I., 2021. The kynurenine pathway—new linkage between innate and adaptive immunity in autoimmune endocrinopathies. Int. J. Mol. Sci. 22, 9879. https://doi.org/10.3390/IJMS22189879.

Kwiatkowski, K., Popiolek-Barczyk, K., Piotrowska, A., Rojewska, E., Ciapała, K., Makuch, W., Mika, J., 2019. Chemokines CCL2 and CCL7, but not CCL12, play a significant role in the development of pain-related behavior and opioid-induced analgesia. Cytokine 119, 202–213. https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2019.03.007.

Latremoliere, A., Latini, A., Andrews, N., Cronin, S.J., Fujita, M., Gorska, K., Hovius, R., Romero, C., Chuaiphichai, S., Painter, M., Miracca, G., Babaniyi, O., Remor, A.P., Duong, K., Riva, P., Barrett, L.B., Ferreirós, N., Naylor, A., Penninger, J.M., Tegeder, I., Zhong, J., Blagg, J., Channon, K.M., Johnsson, K., Costigan, M., Woolf, C. J., 2015. Reduction of neuropathic and inflammatory pain through inhibition of the tetrahydrobiopterin pathway. Neuron 86, 1393–1406. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2015.05.033.

Liu, S., Karaganis, S., Mo, R.F., Li, X.X., Wen, R.X., Song, X.J., 2020. IFNβ treatment inhibits nerve injury-induced mechanical allodynia and MAPK signaling by activating ISG15 in mouse spinal cord. J. Pain 21, 836–847. https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.11.010.

Lugo-Huitrón, R., Ugalde Muñiz, P., Pineda, B., Pedraza-Chaverrí, J., Ríos, C., Pérez-De La Cruz, V., 2013. Quinolinic acid: An endogenous neurotoxin with multiple targets. Oxidative Med. Cell. Longev. https://doi.org/10.1155/2013/104024.

Mándi, Y., Vécsei, L., 2011. The kynurenine system and immunoregulation. J. Neural Transm. 1192 (119), 197–209. https://doi.org/10.1007/S00702-011-0681-Y.

Matheus, L.H.G., Dalmazzo, S.V., Brito, R.B.O., Pereira, L.A., De Almeida, R.J., Camacho, C.P., Dellê, H., 2020. 1-methyl-D-tryptophan activates aryl hydrocarbon receptor, a pathway associated with bladder cancer progression. BMC Cancer 20, 869. https://doi.org/10.1186/s12885-020-07371-6.

Mecs, L., Tuboly, G., Nagy, E., Benedek, G., Horvath, G., 2009. The peripheral antinociceptive effects of endomorphin-1 and kynurenic acid in the rat inflamed joint model. Anesth. Analg. 109, 1297–1304. https://doi.org/10.1213/ane.0b013e3181b21c5e.

Mika, J., Osikowicz, M., Makuch, W., Przewlocka, B., 2007. Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. Eur. J. Pharmacol. 560, 142–149. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.01.013.

Mika, J., Popiolek-Barczyk, K., Rojewska, E., Makuch, W., Starowicz, K., Przewlocka, B., 2014. Delta-opioid receptor analgesia is independent of microglial activation in a rat model of neuropathic pain. PLoS One 9, e104420. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0104420.

Mithaiwala, M.N., Santana-Coelho, D., Porter, G.A., O'connor, J.C., 2021. Neuroinflammation and the kynurenine pathway in CNS disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. Cells 10, 1548. https://doi.org/10.3390/CELLS10061548.

Moroni, F., Carpenedo, R., Cozzi, A., Meli, E., Chiarugi, A., Pellegrini-Giampietro, D.E., 2003. Studies on the neuroprotective action of kynurenine mono-oxygenase inhibitors in post-ischemic brain damage. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 127–136. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0135-0_15.

Moyer, B.J., Rojas, I.Y., Murray, I.A., Lee, S., Hazlett, H.F., Perdew, G.H., Tomlinson, C. R., 2017. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors activate the aryl hydrocarbon receptor. Toxicol. Appl. Pharmacol. 323, 74–80. https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2017.03.012.

Nakamura, A., Hasegawa, M., Minami, K., Kanbara, T., Tomii, T., Nishiyori, A., Narita, M., Suzuki, T., Kato, A., 2013. Differential activation of the μ-opioid receptor by oxycodone and morphine in pain-related brain regions in a bone cancer pain model. Br. J. Pharmacol. 168, 375–388. https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2012.02139.X.

Németh, H., Toldi, J., Vécsei, L., 2005. Role of kynurenines in the central and peripheral nervous systems. Curr. Neurovasc. Res. 2, 249–260.

Neradugomma, N.K., Liao, M.Z., Mao, Q., 2017. Buprenorphine, norbuprenorphine, R-methadone, and S-methadone upregulate BCRP/ABCG2 expression by activating aryl hydrocarbon receptor in human placental trophoblasts. Mol. Pharmacol. 91, 237–249. https://doi.org/10.1124/MOL.116.107367/-/DC1.

Novikov, O., Wang, Z., Stanford, E.A., Parks, A.J., Ramirez-Cardenas, A., Landesman, E., Laklouk, I., Sarita-Reyes, C., Gusenleitner, D., Li, A., Monti, S., Manteiga, S., Lee, K., Sherr, D.H., 2016. An aryl hydrocarbon receptor-mediated amplification loop that enforces cell migration in ER-/PR-/Her2- human breast cancer cells. Mol. Pharmacol. 90, 674–688. https://doi.org/10.1124/mol.116.105361.

Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Opitz, U., Sahm, F., Ochs, K., Lutz, C., Wick, W., Platten, M., 2011a. The indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-d-tryptophan upregulates IDO1 in human cancer cells. PLoS One 6. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019823.

Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., Jugold, M., Guillemin, G.J., Miller, C.L., Lutz, C., Radlwimmer, B., Lehmann, I., von Deimling, A., Wick, W., Platten, M., 2011b. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. Nature 478, 197–203. https://doi.org/10.1038/nature10491.

Pawlik, K., Ciechanowska, A., Ciapała, K., Rojewska, E., Makuch, W., Mika, J., 2021. Blockade of CC chemokine receptor type 3 diminishes pain and enhances opioid analgesic potency in a model of neuropathic pain. Front. Immunol. 12, 4627. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.781310.

Pineda-Farias, J.B., Pérez-Severiano, F., González-Esquivel, D.F., Barragán-Iglesias, P., Bravo-Hernández, M., Cervantes-Durán, C., Aguilera, P., Ríos, C., Granados-Soto, V., 2013. The l -kynurenine-probenecid combination reduces neuropathic pain in rats. Eur. J. Pain 17, 1365–1373. https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2013.00305.x.

Popiolek-Barczyk, K., Rojewska, E., Jurga, A.M., Makuch, W., Zador, F., Borsodi, A., Piotrowska, A., Przewlocka, B., Mika, J., 2014. Minocycline enhances the effectiveness of nociceptin/orphanin FQ during neuropathic pain. Biomed. Res. Int. 2014, 1–12. https://doi.org/10.1155/2014/762930.

Rashid, H., Inoue, M., Toda, K., Ueda, H., 2004. Loss of peripheral morphine analgesia contributes to the reduced effectiveness of systemic morphine in neuropathic pain. J. Pharmacol. Exp. Ther. 309, 380–387. https://doi.org/10.1124/JPET.103.060582.

Resta, F., Masi, A., Sili, M., Laurino, A., Moroni, F., Mannaioni, G., 2016. Kynurenic acid and zaprinast induce analgesia by modulating HCN channels through GPR35 activation. Neuropharmacology 108, 136–143. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2016.04.038.

Rojewska, E., Korostynski, M., Przewlocki, R., Przewlocka, B., Mika, J., 2014. Expression profiling of genes modulated by minocycline in a rat model of neuropathic pain. Mol. Pain 10. https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-47.

Rojewska, E., Piotrowska, A., Makuch, W., Przewlocka, B., Mika, J., 2016. Pharmacological kynurenine 3-monooxygenase enzyme inhibition significantly reduces neuropathic pain in a rat model. Neuropharmacology 102, 80–91. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.040.

Rojewska, E., Ciapała, K., Piotrowska, A., Makuch, W., Mika, J., 2018a. Pharmacological inhibition of Indoleamine 2,3-Dioxygenase-2 and kynurenine 3-monooxygenase, enzymes of the kynurenine pathway, significantly diminishes neuropathic pain in a rat model. Front. Pharmacol. 9, 724. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00724.

Rojewska, E., Wawrzczak-Bargiela, A., Szucs, E., Benyhe, S., Starnowska, J., Mika, J., Przewlocki, R., Przewlocka, B., 2018b. Alterations in the activity of spinal and thalamic opioid Systems in a Mice Neuropathic Pain Model. Neuroscience 390, 293–302. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.08.013.

Rojewska, E., Ciapała, K., Mika, J., 2019. Kynurenic acid and zaprinast diminished CXCL17-evoked pain-related behaviour and enhanced morphine analgesia in a mouse neuropathic pain model. Pharmacol. Rep. 71, 139–148. https://doi.org/10.1016/J.PHAREP.2018.10.002.

Saito, K., Nowak, T.S., Suyama, K., Quearry, B.J., Saito, M., Crowley, J.S., Markey, S.P., Heyes, M.P., 1993. Kynurenine pathway enzymes in brain: responses to ischemic brain injury versus systemic immune activation. J. Neurochem. 61, 2061–2070. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb07443.x.

Savitz, J., 2020. The kynurenine pathway: a finger in every pie. Mol. Psychiatry. https://doi.org/10.1038/s41380-019-0414-4.

Schwarcz, R., Stone, T.W., 2017. The kynurenine pathway and the brain: challenges, controversies and promises. Neuropharmacology 112, 237–247. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.003.

Schwarcz, R., Okuno, E., White, R.J., Bird, E.D., Whetsell, W.O., 1988. 3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington disease victims. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85, 4079–4081. https://doi.org/10.1073/pnas.85.11.4079.

Shimizu, S., 2004. Routes of administration. In: The Laboratory Mouse. Elsevier Inc, pp. 527–542. https://doi.org/10.1016/B978-012336425-8/50085-6.

Stone, T.W., 1993. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. Pharmacol. Rev. 45.

Turner, P.V., Brabb, T., Pekow, C., Vasbinder, M.A., 2011. Administration of substances to laboratory animals: Routes of administration and factors to consider. J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.

Urenjak, J., Obrenovitch, T.P., 2000. Neuroprotective potency of kynurenic acid against excitotoxicity. Neuroreport 11, 1341–1344. https://doi.org/10.1097/00001756-200004270-00038.

Vamos, E., Pardutz, A., Klivenyi, P., Toldi, J., 2009. The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection. J. Neurol. Sci. 283, 21–27. https://doi.org/10.1016/J.JNS.2009.02.326.

van Hecke, O., Austin, S.K., Khan, R.A., Smith, B.H., Torrance, N., 2014. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. Pain 155, 654–662. https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.11.013.

Wang, J., Simonavicius, N., Wu, X., Swaminath, G., Reagan, J., Tian, H., Ling, L., 2006. Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. J. Biol. Chem. 281, 22021–22028. https://doi.org/10.1074/jbc.M603503200.

Watkins, L.R., Hutchinson, M.R., Ledeboer, A., Wieseler-Frank, J., Milligan, E.D., Maier, S.F., 2007. Glia as the "bad guys": implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. Brain Behav. Immun. 21, 131–146. https://doi.org/10.1016/J.BBI.2006.10.011.

Wirthgen, E., Leonard, A.K., Scharf, C., Domanska, G., 2020. The immunomodulator 1-methyltryptophan drives tryptophan catabolism toward the Kynurenic acid branch. Front. Immunol. 11, 313. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00313/BIBTEX.

Wonodi, I., Stine, O.C., Sathyasaikumar, K.V., Roberts, R.C., Mitchell, B.D., Hong, L.E., Kajii, Y., Thaker, G.K., Schwarcz, R., 2011. Downregulated kynurenine 3-monooxygenase gene expression and enzyme activity in schizophrenia and genetic association with schizophrenia endophenotypes. Arch. Gen. Psychiatry 68, 665–674. https://doi.org/10.1001/ARCHGENPSYCHIATRY.2011.71.

Yu, C.-P., Pan, Z.-Z., Luo, D.-Y., 2016. TDO as a therapeutic target in brain diseases. Metab. Brain Dis. 31, 737–747. https://doi.org/10.1007/s11011-016-9824-z.

Zhou, H.Y., Chen, S.R., Pan, H.L., 2011. Targeting N-methyl-D-aspartate receptors for treatment of neuropathic pain. Expert. Rev. Clin. Pharmacol. 4, 379. https://doi.org/10.1586/ecp.11.17.

Zhou, W., Dantzer, R., Budac, D.P., Walker, A.K., Mao-Ying, Q.-L., Lee, A.W., Heijnen, C. J., Kavelaars, A., 2015. Peripheral indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is required for comorbid depression-like behavior but does not contribute to neuropathic pain in mice. Brain Behav. Immun. 46, 147–153. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.01.013.

Zwilling, D., Huang, S.Y., Sathyasaikumar, K.V., Notarangelo, F.M., Guidetti, P., Wu, H. Q., Lee, J., Truong, J., Andrews-Zwilling, Y., Hsieh, E.W., Louie, J.Y., Wu, T., Scearce-Levie, K., Patrick, C., Adame, A., Giorgini, F., Moussaoui, S., Laue, G., Rassoulpour, A., Flik, G., Huang, Y., Muchowski, J.M., Masliah, E., Schwarcz, R., Muchowski, P.J., 2011. Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. Cell 145, 863–874. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.020.

4.3. Rola wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych ze szczególnym uwzględnieniem kinaz MAP w patogenezie bólu neuropatycznego – *praca przeglądowa* Ciapała i Mika, *Pharmaceuticals*, 2023

Ból neuropatyczny stanowi poważny problem kliniczny o złożonej i wieloczynnikowej patogenezie, obejmującej zarówno zaburzenia w obrębie układu nerwowego, jak i procesy immunologiczne oraz metaboliczne, a jego leczenie jest niezwykle trudne[190]. W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na komórkowe mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska, co stwarza nowe możliwości identyfikacji potencjalnych punktów uchwytu. Zasadniczą rolę w rozwoju i utrzymywaniu się bólu neuropatycznego odgrywają mikroglej i makrofagi, które w odpowiedzi na uszkodzenie nerwów ulegają silnej aktywacji w układzie nerwowym i uwalniają liczne mediatory probólowe[26,191]. W literaturze podkreśla się fakt, że wraz z aktywacją mikrogleju/makrofagów dochodzi do zwiększonej fosforylacji białka p38[106,192], które należy do grupy MAPK, do której zaliczamy ponadto ERK oraz JNK[85]. Pierwsze badania dotyczące MAPK w procesach nocyceptywnych koncentrowały się na wyjaśnieniu ich znaczenia w podtrzymywaniu plastyczności neuronalnej[92], natomiast wieloletnie badania prowadzone w Zakładzie Farmakologii Bólu IF PAN były ukierunkowane na określenie ich roli w bólu neuropatycznym[25,106,184,193–195]. Stosowano w tym celu minocyklinę, antybiotyk z grupy tetracyklin, który jest nie tylko inhibitorem p38[196,197] ale również metaloproteinazy macierzy 9 (ang. *matrix metalloproteinase 9*, MMP-9)[106,198]. Dowiedziono, że związek ten obniża nadwrażliwość u zwierząt w modelach bólu neuropatycznego[25,193,199,200], także poprzez hamowanie aktywacji mikrogleju/makrofagów[25,195]. Wyniki te zainspirowały mnie do poszukiwania substancji o szerokim spektrum działania, zdolnych do modulowania kinaz MAP i mogących wykazywać efekty przeciwbólowe. Przygotowania do planowania badań eksperymentalnych rozpoczęłam od szczegółowej analizy dostępnego piśmiennictwa, a jej wyniki przedstawiłam w pracy przeglądowej (Ciapała i Mika, *Pharmaceuticals*, 2023)[141]. Wyróżniłam w niej kilka substancji o wielokierunkowym wpływie na kinazy i czynniki transkrypcyjne kluczowe dla rozwoju bólu neuropatycznego[201–203]. Moją uwagę zwróciły związki o korzystnym profilu bezpieczeństwa, w tym fisetyna i astaksantyna, dostępne obecnie w postaci suplementów diety[204,205]. Co ważne, dane literaturowe wskazywały, że poza modulacją sygnalizacji MAPK, działają one również na ścieżkę PI3K/AKT oraz czynniki transkrypcyjne NF-κB i Nrf2, które, jak wskazywała dostępna literatura, także zaangażowane są w rozwój bólu neuropatycznego[83,85,206].

Moją inspiracją do podjęcia badań była obserwacja, że związki modulujące jednocześnie kilka spośród kluczowych dla neuropatii wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych mogą stanowić istotny kierunek w poszukiwaniu skuteczniejszych metod leczenia bólu neuropatycznego. Dlatego w ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadziłam eksperymenty dotyczące wpływu wybranych substancji na rozwój i utrzymywanie się objawów bólu neuropatycznego oraz na działanie leków opioidowych, a ich wyniki opublikowałam w 3 pracach oryginalnych, stanowiących podstawę niniejszej rozprawy (Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2023[171], *Pharmacol Rep*, 2024[172], *Neurotherapeutics*, 2025[173]).

pharmaceuticals

MDPI

Review

Advances in Neuropathic Pain Research: Selected Intracellular Factors as Potential Targets for Multidirectional Analgesics

Katarzyna Ciapała and Joanna Mika *

Department of Pain Pharmacology, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, 12 Smetna Str., 31-343 Kraków, Poland; kat.ciapala@gmail.com

* Correspondence: joamika@if-pan.krakow.pl or joasia272@onet.eu; Tel.: +48-(12)-6623298; Fax: +48-(12)-6374500

Abstract: Neuropathic pain is a complex and debilitating condition that affects millions of people worldwide. Unlike acute pain, which is short-term and starts suddenly in response to an injury, neuropathic pain arises from somatosensory nervous system damage or disease, is usually chronic, and makes every day functioning difficult, substantially reducing quality of life. The main reason for the lack of effective pharmacotherapies for neuropathic pain is its diverse etiology and the complex, still poorly understood, pathophysiological mechanism of its progression. Numerous experimental studies, including ours, conducted over the last several decades have shown that the development of neuropathic pain is based on disturbances in cell activity, imbalances in the production of pronociceptive factors, and changes in signaling pathways such as p38MAPK, ERK, JNK, NF-κB, PI3K, and NRF2, which could become important targets for pharmacotherapy in the future. Despite the availability of many different analgesics, relieving neuropathic pain is still extremely difficult and requires a multidirectional, individual approach. We would like to point out that an increasing amount of data indicates that nonselective compounds directed at more than one molecular target exert promising analgesic effects. In our review, we characterize four substances (minocycline, astaxanthin, fisetin, and peimine) with analgesic properties that result from a wide spectrum of actions, including the modulation of MAPKs and other factors. We would like to draw attention to these selected substances since, in preclinical studies, they show suitable analgesic properties in models of neuropathy of various etiologies, and, importantly, some are already used as dietary supplements; for example, astaxanthin and fisetin protect against oxidative stress and have anti-inflammatory properties. It is worth emphasizing that the results of behavioral tests also indicate their usefulness when combined with opioids, the effectiveness of which decreases when neuropathy develops. Moreover, these substances appear to have additional, beneficial properties for the treatment of diseases that frequently co-occur with neuropathic pain. Therefore, these substances provide hope for the development of modern pharmacological tools to not only treat symptoms but also restore the proper functioning of the human body.

Keywords: neuropathic pain; minocycline; astaxanthin; fisetin; peimine; p38MAPK; ERK; JNK; NF-κB; PI3K; NRF2

check for updates

Citation: Ciapała, K.; Mika, J. Advances in Neuropathic Pain Research: Selected Intracellular Factors as Potential Targets for Multidirectional Analgesics. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1624. https://doi.org/10.3390/ph16111624

Academic Editor: Agnieszka Pałucha-Poniewiera

Received: 26 October 2023
Revised: 13 November 2023
Accepted: 15 November 2023
Published: 17 November 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Neuropathic Pain

According to the definition formulated by the International Association for the Study of Pain (IASP), neuropathic pain is caused by somatosensory nervous system damage or disease and affects approximately 7–10% of the population [1,2]. It is manifested by abnormal sensations (dysesthesia) or pain caused by physiologically painless stimuli (allodynia) of a continuous or paroxysmal nature. People affected by this type of pain exhibit symptoms such as burning, tingling or stabbing pain [1]. These symptoms significantly reduce quality of life and have a negative impact on the physical, emotional, and social aspects of human functioning. Central neuropathic pain occurs in spinal cord injuries and multiple sclerosis, and sometimes accompanies strokes. Apart from diabetes (diabetic

neuropathy) and other conditions associated with metabolic disorders, the most common causes of painful peripheral neuropathies are shingles; neuropathies associated with HIV infection; nutritional deficiencies; toxins; and genetic and immunological diseases [3]. This type of pain is also common in cancer, not only as a direct effect of the tumor on the peripheral nerves, but also a side effect of some chemotherapeutic agents or as a result of damage caused by radiation [4]. Neuropathic pain is distinguished by a reduced sensitivity to treatment with conventional painkillers; weaker effects of the two main groups of analgesics, opioids and nonsteroidal anti-inflammatory drugs, are observed. Therefore, its therapy requires a more comprehensive and interdisciplinary approach [1]. Currently, pregabalin and gabapentin, including extended-release formulations, as well as tricyclic antidepressants, are recommended as first-line drugs; second-line drugs are patches with capsaicin, lidocaine or tramadol; and third-line drugs are opioids and botulinum toxin type A [3].

Despite intensive research into neuropathic pain mechanisms, most available pharmacological treatments are based on old medicaments or drugs designated for other therapeutic interventions. Importantly, according to statistics, less than half of patients suffering from neuropathic pain report actual pain relief [2], which indicates the need for new drugs and more effective therapies for this condition. The latest data in the literature, including ours, suggest that, in addition to substances directed against one specific target, compounds with a broader spectrum of action may have analgesic properties. This is understandable when taking into consideration the complexity of neuropathic pain patomechanisms. For years, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family has been considered as one of the most important intracellular signaling pathways influencing nociceptive transmission in neuropathic pain. Initially, researchers focused on neurons, but in the last two decades, many studies have pointed out the important role of MAPKs in glial cells [5–16]. The MAPK family consists of three members, p38, extracellular signal-regulated kinase (ERK), and c-Jun N-terminal kinase (JNK); they are components of a series of crucial signal transduction pathways that regulate processes such as embryogenesis, cell differentiation, cell proliferation, and cell death [17]. MAPKs have a hierarchical structure, and consist of MAPK class kinases that are phosphorylated and activated by MAPKK (or MAP2K), which are in turn phosphorylated and regulated by MAPKKK (or MAP3K). Typically, MAPKKKs are activated by interactions with proteins belonging to the family of small GTPase proteins such as Ras/Rap or RhoA [18]. In our opinion, MAPK kinases may be promising therapeutic targets in neuropathic pain, especially when comodulated with other factors involved in nociception. In the following paper, using the PubMed database (applied keywords: neuropathic pain, minocycline, astaxanthin, fisetin, peimine, p38MAPK, ERK, JNK, NF-κB, PI3K, and/or NRF2), we discuss some of the interesting multitarget substances that exert analgesic effects to draw attention to their possible usefulness for neuropathic pain management. Importantly, among these are dietary supplements that are relatively safe to use and naturally derived, which makes them exceptionally interesting for further investigations.

2. MAPKs and Neuropathic Pain

p38 mitogen-activated protein kinases (p38 MAPKs) are a family of serine/threonine kinases expressed by many cells and consist of four isoforms: p38α, p38β, p38γ and p38δ. It has already been shown in rodent studies that, after nerve injury, the activation of p38 takes place in spinal microglia but not in neurons or astrocytes [8,15,19,20]. It is well established that p38 contributes to the development of neuropathic pain and additionally influences opioid treatment effectiveness [15,19–24]. Many pharmacological studies have provided evidence that the intrathecal administration of selective p38 inhibitors (skepinone-L [25], SB203580 [15,19,26,27], FR167653 [24], and CNI-1493 [28]) diminish the development of neuropathic pain. Moreover, FR167653 improves morphine analgesia in diabetic mice [29], and that SB203580 delays morphine tolerance development in rats [30]. It was also shown that an intraperitoneal injection of the p38α MAPK inhibitor SD-282 reversed or prevented

alterations in mechanical and thermal responses induced by prolonged hyperglycemia in diabetic rats [31]. Importantly, the first clinical trials were undertaken to evaluate the analgesic action of the potent p38 inhibitors, dilmapimod (SB-681323) [32] and losmapimod (GW856553) [33], in patients suffering from neuropathic pain. Dilmapimod appeared to be promising; however, it needs to be further evaluated in larger trials to precisely determine the potency of its analgesic effect. The involvement of p38 in nociception is still under investigation. Behavioral experiments showed that the recently discovered FGA-19, which acts as a docking-site-oriented p38 inhibitor, relieves inflammatory pain [34]. Additionally, a new pyridin-2(1H)one derivative was developed, which is a selective p38 inhibitor that alleviates mechanical hypersensitivity in inflammatory pain [35]. Both compounds are extremely interesting but have not yet been studied in the context of neuropathic pain. The experimental data provide evidence that p38 activation is initiated by the stimulation of NMDA receptors and participates in hyperalgesia [36]. In many neuropathic pain models, increased activation of p38MAPK is observed in microglia [11,19,24,37,38]. p38 MAPK is involved in the synthesis of many pronociceptive factors via transcriptional regulation [8,12,26,39–41]. It was shown that an increase in p38 levels in microglia enhances the synthesis of pronociceptive factors such as TNFα, IL-1β, IL-18, IL-6 and iNOS [8,42–49]. Interestingly, p38 activation in microglia was thought to play an equivalent role in both sexes; however, recently, it was shown that first, nerve injury primarily activates spinal p38 in male mice, and second, that an intrathecal injection of the selective p38 inhibitor skepinone reduced neuropathic pain in male but not in female rodents [25]. This is important information because clinical data clearly indicate that neuropathic pain develops much more often in women and is more difficult to treat [50]. The latest trends in research on the neuroimmune basis of neuropathic pain focus on sexual dimorphism, and the main difference between sexes is the activation of microglia.

Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) are serine/threonine kinases that also belong to the MAPK family. ERK1/2 kinases are involved in many cellular regulation processes and are important for nociceptive transmission [5,51–54]. ERK signaling can be altered by blocking the upstream protein kinases MEK1/2 (mitogen-activated protein kinase 1/2). ERK1/2 kinases affect the function of the A-type potassium channel Kv4.2 [55] and voltage-dependent calcium channels in sensory neurons [56]. However, ERK1/2 kinases are activated in both neurons and glia after nerve and spinal cord injury, which causes the development of hypersensitivity [8,16,21,57]. The available literature clearly indicates that ERK activation is crucial for the development of neuropathic pain symptoms because it causes the secretion of many pronociceptive factors, such as TNFα, IL-1β, iNOS, and nNOS [8,21,22,58]. It has already been shown that the intrathecal injection of selective MEK-ERK pathway inhibitors, such as U0126 [57,59], PD198306 [60], and PD98059 [8,16,22], reduces neuropathic pain symptoms in rodent models. Moreover, it has been demonstrated that PD98059 reduces nerve injury and elevates the levels of p38, ERK1/2, JNK, and pronociceptive factors such as IL-1beta, IL-6, and iNOS [22]. The latest research also indicates that repeated intrathecal injections of U0126 [59] and PD98059 [22] potentiate morphine and/or buprenorphine analgesia in rats with neuropathic pain. Moreover, PD98059 delays morphine tolerance development in rats [30]. Interestingly, it was recently shown, using an oxaliplatin-induced neuropathic pain model, that the activation of ERK1/2 kinases promotes the expression and activation of CREB, which leads to an increase in Nav1.6 protein expression, enhancing neuronal excitability and evoking pain [61]. The results of numerous studies clearly indicate the important role of the MEK/ERK signaling pathway in neuropathic pain.

c-Jun N-terminal kinase (JNK) is the third major member of the MAPK family, with three isoforms, JNK1, JNK2 and JNK3 [62]. JNKs have been revealed to be involved in neurodegeneration and inflammatory responses [7,62–64]. In mammals, the JNK1 and JNK2 proteins are ubiquitously expressed, whereas JNK3 is found almost exclusively in the brain [65]. The results show that JNK3 is present in neurons, but JNK1 is mainly expressed in nonneuronal cells, including immune cells [7,66,67]. JNK1 and JNK2 are expressed in the

spinal cord [7]; however, JNK1 is predominantly upregulated in astroglial cells after nerve injury [7,22,68]. Compared to p38 and ERK, much less is known about how JNK regulates nociception. To date, JNK activation appears in DRGs in primary sensory neurons after nerve injury but only in the early phase of neuropathy (until day 10) [7]. In contrast, at the spinal cord level, JNK upregulation is observed in astrocytes over a long period of time. Therefore, it is suggested that this kinase is especially important with respect to the persistence of neuropathic pain. It was already shown that SP600125, a small-molecule inhibitor of JNK1/2/3, diminishes spinal nerve ligation-induced neuropathic pain [7] and prevents hypersensitivity induced by the antiretrovirals zalcitabine and stavudine in mice [69]. Similarly, the intrathecal administration of D-JNKI-1, JNK1/2/3 inhibitor, diminishes spinal nerve ligation-induced hypersensitivity by suppressing the phosphorylation of c-Jun in spinal astrocytes [7]. Moreover, the infusion of D-JNKI-1 into the L5 DRG prevented, but did not reverse, previously established tactile hypersensitivity [7]. In summary, JNK activation in the DRG and spinal cord plays distinct roles in regulating the development and maintenance of neuropathic pain, respectively. Targeting the JNK pathways in glia and sensory neurons may represent a novel effective treatment for intractable neuropathic pain symptoms.

In summary, taking into account both the literature and our many years of research, we think that, in the treatment of neuropathic pain, pharmacological tools with broad-spectrum actions are particularly valuable. In our review, we paid attention to substances that not only have a beneficial effect on kinases from the MAP family but also influence several nociceptive factors listed as targets in Table 1. We focused on four substances, briefly presenting their mechanism of action, impacts on nociceptive factors and effects on opioid treatment efficacy in neuropathy. In the following sections, we discuss in detail the importance of minocycline, astaxanthin, fisetin, and peimine in nociceptive transmission and present data on their analgesic effects on neuropathic pain. Additionally, we also include information about other properties of these substances that are not directly related to nociception but are useful from a clinical point of view.

Table 1. Summary of suggested targets of minocycline, astaxanthin, fisetin, and peimine and their influence on important factors in nociception and on the effectiveness of opioid treatment in various animal models of neuropathic pain.

NEUROPATHIC PAIN				
SUBSTANCE	**SUGGESTED DIRECT TARGETS**	**NEUROPATHIC PAIN ANIMAL MODELS**	**INFLUENCE ON IMPORTANT FACTORS IN NOCICEPTION**	**EFFECT ON OPIOID TREATMENT EFFECTIVENESS**
Minocycline	**p38** [42,70,71] **ERK** [72] **MMP9** [73]	**CCI** (mouse) [74,75] **CCI (rats)** [76,77] **SCI (rats)** [78] **STZ (rats)** [79] **SNL (rats)** [70] **STZ (mouse)** [80]	**iNOS** ↓ [81] **IL-1β** [82] **IL-6** ↓ [26] **IL-18** ↓ [26] **MMP9** ↓ [26] **MMP2** ↓ [26] **XCL1** ↓ [83] **pERK** ↓ [72,84] **PI3K** ↓ [84]	**morphine** ↑ [26,74]
Astaxanthin	**p38** [85] **ERK** [85] **NF-κB** [86] **NR2B** [87] **ROS** [88]	**SNL (mouse)** [85] **CCI (rat)** [89] **SCI (rat)** [87] **CCI (mouse)** [90]	**IL-1β** ↓ [85] **IL-6** ↓ [85] **IL-4** ↑ [85] **IL-10** ↑ [85] **pERK** ↓ [85] **pp38** ↓ [85] **NF-κB** ↓ [85]	**morphine** ↑ [90] **buprenorphine** ↑ [90] **oxycodone** ↑ [90]

Table 1. *Cont.*

NEUROPATHIC PAIN				
SUBSTANCE	**SUGGESTED DIRECT TARGETS**	**NEUROPATHIC PAIN ANIMAL MODELS**	**INFLUENCE ON IMPORTANT FACTORS IN NOCICEP-TION**	**EFFECT ON OPIOID TREATMENT EFFECTIVENESS**
Peimine	**p38** [91] **ERK** [92] **JNK** [92] **NF-κB** [92] **Kv1.3** [93] **Nav1.7** [93]	**CCI (mouse)** [90]	————	**morphine** ↑ [90]
Fisetin	**p38** [94] **ERK** [95] **Pi3K** [96] **NF-κB** [97] **5HT7** [98] **GABA** [99]	**CCI (mouse)** [98] **CCI (mouse)** [90] **STZ (mouse)** [99] **STZ (rat)** [100]	**IL-6** ↓ [100] **TNFα** ↓ [100] **NF-κB**↓ [100] **NRF2** ↑ [100]	**morphine** ↑ [90] **oxycodone** ↑ [90]

Abbreviations: spinal nerve ligation model (SNL); chronic constriction injury of the sciatic nerve model (CCI); spinal cord injury model (SCI), streptozotocin-induced diabetic model (STZ), interleukin (IL); inducible nitric oxide synthase (iNOS); chemokine-C-motif ligand 1 (XCL1); tumor necrosis factor alpha (TNFα); reactive oxygen species (ROS); complement component 1q (C1q); microglia/macrophage markers (Iba, CD11b/c), astroglia marker (GFAP); matrix metalloproteinases (MMP); p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (p38MAPK); Extracellular signal-regulated kinases (ERK); phosphoinositide 3-kinase (PI3K); Nuclear factor kappa B (NF-κB); glutamate N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B (NR2B); 5-hydroxytryptamine 7 receptor (5-HT7); Gamma-Aminobutyric Acid receptor (GABA); Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2 (NRF2); ↓decrease; ↑ increase.

3. MMPs and Neuropathic Pain

Recently, there has been an increasing amount of new information about the important role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the development of neuropathy. MMPs are involved in many proteolytic processes that require matrix remodeling in both physiological and pathological conditions. A previous study showed that MMPs were strongly activated after CNS and PNS injury, contributing to disruption of the blood–brain barrier and enabling the influx of immune cells into the nervous system [101]. Numerous studies indicate that MMP-9 and MMP-2 are involved in nociception. In 2008, it was documented for the first time that L5 spinal nerve ligation induces a quick (24 h after injury) rise in MMP-9 levels in the DRGs of rats. The authors also showed that the level of MMP-2 did not increase until day 7, but lasted up to 21 days [102]. The published results suggest that MMP-9 is responsible for the initiation, while MMP-2 is responsible for the maintenance, of neuropathic pain [102]. Later, it was described that sciatic nerve injury also strongly enhanced the levels of MMP-9 and TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) not only in DRGs but also within the spinal cord [26]. Moreover, it was reported that after axon damage, Schwann cells release a large amount of MMP-9, which contributes to the initiation of macrophage infiltration and degradation of myelin basic protein [103,104]. As a consequence, neuron hypersensitivity occurs, and sensitization develops [105].

Importantly, pharmacological studies conducted in parallel confirmed the important role of MMP-9 in the development of neuropathic pain symptoms. It has been suggested that an intrathecal injection of MMP-9 evokes neuronal hypersensitivity by transforming inactive proIL-1beta to the active IL-1beta form [102]. As a result, there is increased excitability of neurons and uncontrolled activation of microglia in the dorsal horn of the spinal cord [26,102].

Notably, MMP-2 also cleaves IL-1β; however, it activates astrocytes at later time points [102]. Moreover, it was revealed that both the gene deletion of MMP-9 or MMP-9 siRNA administration reduced the development of hypersensitivity in animal models of neuropathic pain [101,102] Similarly, the preemptive and repeated administration of MMP-

9 inhibitor-I for five days after nerve injury delayed hypersensitivity development [102]. Furthermore, the intrathecal administration of antibodies against IL-1beta reduces MMP-9-induced hypersensitivity [102]. Additionally, the administration of TIMP-1 diminishes the development of neuropathy to a similar extent [102]. The results obtained by many researchers indicate that time-dependent changes in MMP-2 and MMP-9 levels offer different options for the treatment of neuropathic pain [102], and that blocking MMP-9 appears to be effective in inhibiting the development of hypersensitivity.

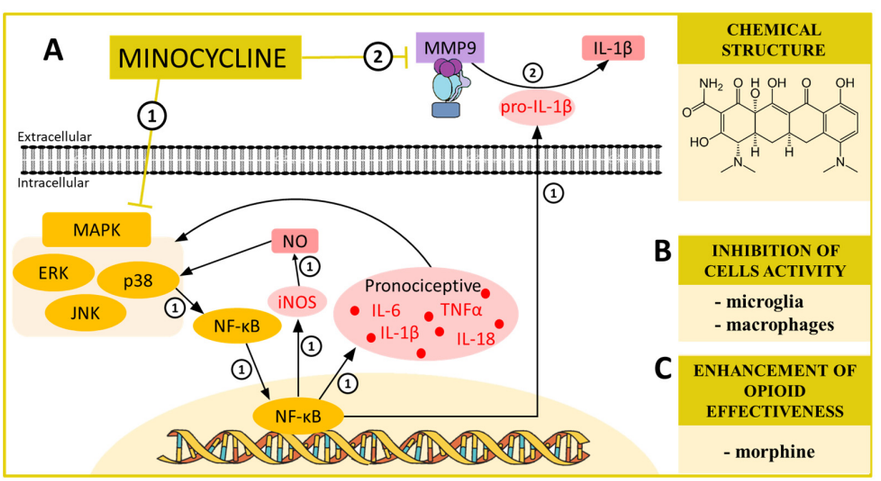
4. MINOCYCLINE—A MAPK and MMP Modulator in Neuropathic Pain

Considering the important role of MAPKs and MMPs in the development of neuropathic pain, it can be assumed that substances which affect these factors will also influence nociception. Previous studies have identified minocycline, a second-generation tetracycline antibiotic that acts against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, as one of these substances [106–109]. Minocycline is a highly lipophilic molecule that can easily pass through the blood–brain barrier [108,110], which enables its use in the treatment of many diseases [107,108,111–125]. Numerous data in the literature indicate that, although minocycline exhibits effects characteristic of antibiotics, it also exerts other biological properties, such as anti-inflammatory, antioxidant, antiapoptotic and immunomodulatory properties [106]. What is more, minocycline also plays a neuroprotective role, which has been confirmed in experimental models of ischemia [123,124], brain [125] and spinal cord [111,112,122] injury, and several neurodegenerative conditions [113–117]. Moreover, preclinical data have confirmed the ability of minocycline to prevent tumor growth [126] and human immunodeficiency virus replication [127].

Importantly, numerous studies have indicated that minocycline reduces neuropathic pain symptoms not only in animal models [26,74,75,81,128–130] but also in humans [131]. In 2006, Piao et al. showed that the molecular mechanism of minocycline's action is the inhibition of p38MAPK in microglia, while in 2013, Niimi et al. provided evidence of its ability to inhibit the activity of MMP-9 [73]. The crucial role of both these molecular targets of minocycline in neuropathic pain is beyond doubt. It was already shown that repeated intraperitoneal and intrathecal minocycline administration strongly diminished microglial activation [11,26,37] by reducing the activation of p38 kinase [11,42]. The inhibition of microglial activation has very important consequences, since these cells have already been shown to be the source of many factors with pronociceptive properties [132,133]. It has already been demonstrated that repeated minocycline administration downregulates pronociceptive factors (IL-6 and IL-18) but does not influence antinociceptive factors (IL-1α, IL-4, and IL-10) [26]. Moreover, in vitro studies showed that minocycline reduces the activation of M1-polarized microglia but does not affect the beneficial M2-polarized microglia [26,103]. The critical role of MMP-9 in the development of neuropathic pain was also confirmed in animal models, as described above. Interestingly, the MMP-9 inhibitor (MMP9-INH. I) was more effective at diminishing neuropathic pain symptoms than a selective p38MAPK inhibitor (SB203580) [26]. Therefore, in our opinion, the excellent analgesic effect of minocycline is related to the direct inhibition of both MMP-9 and p38MAPK, and consequently, after repeated administration, it indirectly affects the levels of spinal pronociceptive factors (IL-1β [82] IL-6 [26]; IL-18 [26]; iNOS [81]; XCL1 [83], MMP-2 [26]) and kinases (pERK [72,84]; PI3K [84]). Importantly, previous studies have revealed that preemptive and repeated intrathecal or intraperitoneal minocycline administration potentiated morphine analgesia [75,130]. Similar results were obtained after intrathecal coadministration of minocycline with selective ligands of the MOP (DAMGO), KOP (U50,488H) and NOP (nociceptin) receptors [129,130]. Notably, minocycline coadministered with morphine strongly delayed the development of morphine tolerance [74]. Its beneficial effect is probably related to the ability of this substance to silence microglial activation, which reduces the production of pronociceptive factors that are capable of exhibiting anti-opioid activity, as suggested by many studies [22,132–142]. These newly discovered properties of minocycline are very promising from a clinical point of view, as there is still a need for drugs

that improve the effectiveness of opioid treatment in patients suffering from neuropathic pain, and that inhibit or delay the development of tolerance to its analgesic effect. The latest data suggest that minocycline has beneficial effects on relieving diabetes-induced or chemotherapy-induced neuropathic pain in humans [131]. Of particular interest are studies indicating that, apart from hypersensitivity reduction, minocycline in a rat model of streptozotocin-induced diabetic neuropathy also has a beneficial effect on cardiodynamic parameters [143] and inhibits kidney damage [144].

In summary, minocycline restores the neuroimmunological balance that is biased toward pronociceptive factors in the development of neuropathic pain. The proposed mechanisms by which minocycline produces its analgesic effects are presented in brief in Scheme 1. Numerous studies provide a rational basis for the further evaluation of minocycline in the treatment of neuropathic pain. A safe translation from animal studies to clinical trials is still challenging. Although minocycline is a well-tolerated drug it exhibits some side effects [120,145,146]; therefore, more studies are still needed.



Scheme 1. (**A**) **The possible mechanisms of minocycline action as indicated by various *in vivo* ①② and *in vitro* ①② studies:** ① inhibition of MAP kinases by minocycline in turn indirectly inhibits NF-κB, and as a consequence, the production of pronociceptive cytokines such as IL-6, IL-1β, IL-18 and TNFα [26,82] and also evokes the inhibition of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) production, which prevents p38 activation by nitric oxide (NO) [81]—blockade of the synthesis of pronociceptive factors may be the cause of the analgesic effect of minocycline; ② inhibition of MMP9, which attenuates the transformation of inactive proIL-1β to the active, pronociceptive IL-1β [73,102]. (**B**) **The influence of minocycline on activation of cells important for neuropathic pain development as proposed by *in vitro* [26,83] and *in vivo* [26,83] studies; and (C) the influence of minocycline on opioid effectiveness in neuropathic pain models** [74]. ***Abbreviations***: mitogen-activated protein kinases (MAPK); extracellular signal-regulated kinase (ERK); p38 mitogen-activated protein kinase (p38); c-Jun N-terminal kinase (JNK); nuclear factor kappa B (NF-κB); inducible nitric oxide synthase (iNOS); nitric oxide (NO); matrix metalloproteinase 9 (MMP9); tumor necrosis factor α (TNFα); interleukin 1 beta (IL-1β); interleukin 6 (IL-6); interleukin 18 (IL-18).

5. NRF2 and Neuropathic Pain

Recent studies have highlighted the potential role of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) pathway in the modulation of neuropathic pain. One of the mechanisms implicated in the pathogenesis of neuropathic pain is oxidative stress, characterized by an imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant defense mechanisms. NRF2 is a transcription factor that plays a crucial role in cellular defense against oxidative stress [147]. Under normal conditions, NRF2 is localized in the cytoplasm and bound to Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) [147]. NRF2 is the product

of the NFE2L2 gene and a member of the cap 'n' collar subfamily of basic-leucine zipper (bZip) transcription factors [148]. NRF2 contains a bZip domain at the C-terminus that is responsible for the formation of heterodimers with other bZip proteins [149]. In response to oxidative stress, NRF2 dissociates from KEAP1, translocases into the nucleus, and by these heterodimers influences approximately 250 human genes located at the regulatory enhancer sequence known as the antioxidant response element (ARE), leading to the upregulation of various antioxidant and cytoprotective enzymes. Studies have shown that NRF2 activation exerts a neuroprotective effect [150].

In animal models of neuropathic pain, NRF2 activation has been shown to attenuate hypersensitivity and reduce neuronal damage [151,152]. This effect is mediated through the upregulation of antioxidant enzymes, such as heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx), which scavenge ROS and protect neurons from oxidative damage. Additionally, NRF2 activation inhibits the production of proinflammatory cytokines, such as TNF-α and IL-1β, which contribute to neuropathic pain hypersensitivity [153]. Interestingly, pharmacological, and genetic research reports crosstalk between NF-κB and NRF2, such that the absence of NRF2 can exacerbate NF-κB activity, leading to increased cytokine production. Moreover, NF-κB can modulate the transcription and activity of NRF2 [154]. In our opinion, understanding these relationships in experimental models should provide insights into the development of pharmacological tools and more effective therapies for neuropathic pain.

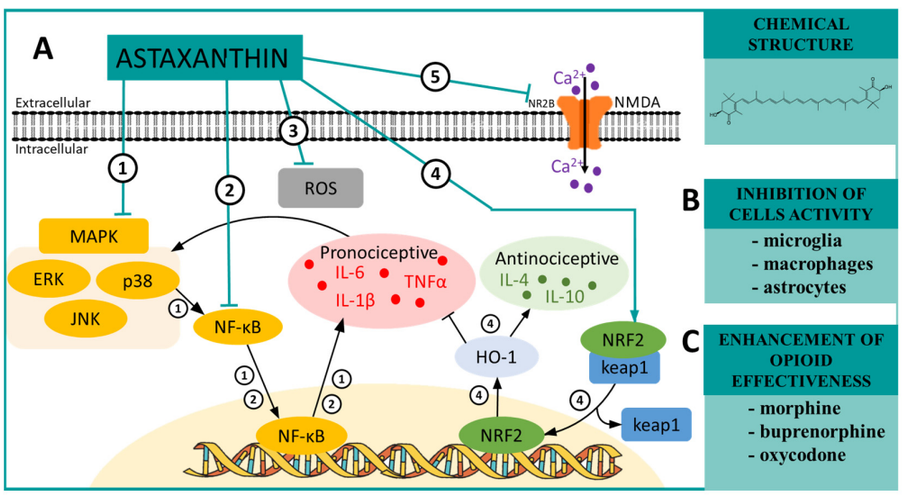
Only a few selective NRF2 modulators have been studied in animal models of neuropathy to date. One of these substances is sulforaphane, a natural compound found in cruciferous vegetables such as broccoli and cabbage [155]. It has been shown to activate NRF2 and exert neuroprotective effects [156]. Studies have demonstrated that sulforaphane administration can reduce neuropathic pain behaviors in animal models by reducing oxidative stress [157,158]. The latest published data indicate that sulforaphane also increases the effectiveness of morphine treatment in neuropathy [157]. Another NRF2 modulator is dimethyl fumarate, which was recently shown to reverse hypersensitivity induced by nerve damage in male and female mice by reducing the injury-induced elevation in IL-1β, CCL2 and TNFα levels [159]. The advantage of dimethyl fumarate is that it is already approved by the FDA for the treatment of multiple sclerosis. Therefore, clinical trials could be initiated to determine its usefulness in the treatment of neuropathic pain of various etiologies [160]. Dimethyl fumarate activates NRF2 by covalently modifying KEAP1, leading to NRF2 release and the subsequent upregulation of antioxidant enzymes [161]. Preclinical studies have shown that dimethyl fumarate administration can alleviate neuropathic pain symptoms by reducing oxidative stress and modulating neuroinflammatory responses [159,162]. Bardoxolone methyl, which is also an activator of NRF2, showed promising results in preclinical studies in the treatment of neuropathic pain caused by nerve damage [90] and diabetes [90,163]. Moreover, the administration of morphine, buprenorphine and oxycodone preceded by the injection of bardoxolone-methyl effectively alleviated tactile and thermal hypersensitivity after sciatic nerve injury [90]. Taking into account the available literature and our own studies, we believe that, from a clinical point of view, the regulation of NRF2 in neuropathy is extremely important, and that pharmacological modulation of this factor may contribute to more effective polytherapy.

6. ASTAXANTHIN—A MAPK and NRF2 Modulator in Neuropathic Pain

Taking into consideration the substantial influence of MAPKs and NRF2 on neuropathic pain development, it can be expected that their modulators would exert excellent analgesic properties. The available literature demonstrates that astaxanthin, a naturally occurring carotenoid that belongs to the xanthophyll family, which is found in various marine organisms, such as microalgae, krill, shrimp, and salmon, is one of these modulators. Astaxanthin is known for its potent antioxidant activity and has been shown to be significantly more effective than other well-known antioxidants, such as vitamin C, vitamin E, and beta-carotene [164]. The molecular structure of astaxanthin enables it to

neutralize free radicals and protect cells from oxidative damage and to reduce the expression levels of pronociceptive factor genes [165]. This makes it potentially beneficial for conditions associated with chronic inflammation, such as arthritis, cardiovascular diseases, and neurodegenerative disorders [166].

A study from 2018 evaluated the analgesic effect of trans-astaxanthin following three weeks of oral administration in mice exposed to sciatic nerve injury [167]. This substance not only ameliorated symptoms of thermal and mechanical hypersensitivity but also reduced depressive-like behaviors induced by long-term neuropathic pain. Additionally, it revealed that the analgesic action of astaxanthin is relatively fast, which may be due to its ability to cross the blood–brain and blood–spinal cord barriers, and even more interestingly, these pain-relieving effects were observed as quickly as four days after the last administration [167]. This effect is a result of its beneficial influence on the serotonergic system and the kynurenine pathway, and the downregulation of pronociceptive cytokines such as IL-1β, IL-6 and TNFα in the spinal cord in mice after sciatic nerve injury [167]. A subsequent study performed in rats following compression spinal cord injury revealed that an intrathecal injection of astaxanthin attenuated neuropathic pain development and reversed motor dysfunction, which is associated with a reduction in elevated levels of p-p38 MAPK, NR2B and TNFα in the spinal cord [87]. The analgesic effect of astaxanthin was also confirmed in other studies conducted on rats after spinal cord injury, where protein analysis showed decreased activation of ERK1/2 and increased activation of AKT after treatment with this drug [168]. Moreover, an additional mechanism by which astaxanthin may exert an analgesic effect is its influence on NMDA receptors. In silico molecular docking studies revealed that astaxanthin fits into the inhibitory binding pocket of the NMDA receptor, and especially into that of NR2B, a subunit important for nociception [89]. It was also shown that, using in vitro studies on C6 glial cells, astaxanthin administration reduced LPS-evoked inflammation by decreasing the activation of astrocytes, which are known to be important in the progression of neuropathic pain [89]. Recent research performed on spinal nerve ligation-exposed mice also confirms the analgesic properties of astaxanthin. The study found that astaxanthin could effectively inhibit neuroinflammation by reducing p-ERK1/2 and p-p38 MAPK activation and the nuclear translocation of NF-κB p65 [85]. In recent years, numerous studies have suggested that a very potent target of astaxanthin is NRF2. It was shown that astaxanthin upregulates the expression of NRF2-dependent antioxidant enzymes and phase II detoxifying enzymes, which help combat oxidative stress and inflammation [169,170]. In complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain in mice, astaxanthin relieved mechanical and thermal hypersensitivity and inhibited the inflammatory response [171]. Although the anti-inflammatory, antioxidative and anti-neuropathic effects of astaxanthin have been previously highlighted, its peripheral antinociceptive mechanisms are not fully understood. Newer studies also suggest the involvement of the l-arginine/NO/cGMP/K_{ATP} pathway in the analgesic effect of astaxanthin [172]. Moreover, it was also reported that the intrathecal administration of astaxanthin in mice subjected to sciatic nerve injury increased the effectiveness of morphine, buprenorphine and oxycodone [90]. Importantly, in 2023, the results of a multicenter clinical trial were published, showing that the drug FlexPro MD®, containing astaxanthin, is well tolerated and can be effectively used to treat pain in patients with osteoarthritis [173]. Additionally, there are data that suggest that astaxanthin may influence different states that sometimes co-occur with neuropathic pain and are related to its etiology; for example, it has preventive effects against diabetes, as indicated by lower glucose levels after supplementation with this substance [174,175]. There are also initial reports indicating that astaxanthin can block the proliferation of cancer cells, which is also a promising prognostic, because neuropathic pain often develops as a result of tumors [176,177]. What is more, this substance also exerts neuroprotective [178] and cardioprotective [179] properties. The suggested targets affected by astaxanthin are presented in brief in Scheme 2. Further research, primarily preclinical research, should be conducted to determine the usefulness and mechanism of action of astaxanthin in neuropathies of various etiologies.



Scheme 2. (**A**) **The possible mechanisms of astaxanthin action as indicated by various *in vivo* ①②④⑤ and *in vitro* ③ studies:** ① inhibition of MAP kinases by astaxanthin, which in turn indirectly inhibits NF-κB, and as a consequence, the production of pronociceptive cytokines, such as IL-6, IL-1β [85], is lowered; ② inhibitory effect on NF-κB, which causes a decrease in the synthesis of the aforementioned pronociceptive factors [86]; ③ inhibition of the ROS production, which are involved in maintenance of persistent pain [88]; ④ activation of NRF2, which causes the dissociation of keap1 with translocation of NRF2 to the nucleus, and as a consequence, an increase in HO-1 synthesis, which evokes reduction of pronociceptive factors levels, and simultaneously increases the production of antinociceptive cytokines [171]; ⑤ inhibition of the NR2B, NMDA receptor subunit, which, as a consequence, reduces Ca^{2+} mobilization and diminishes hypersensitivity [87]. (**B**) **The influence of astaxanthin on the activation of cells important for neuropathic pain development as proposed by *in vitro* [85] and *in vivo* [85] studies; and (C) the influence of astaxanthin on opioid effectiveness in a neuropathic pain model** [90]. ***Abbreviations:*** mitogen-activated protein kinases (MAPK); extracellular signal-regulated kinase (ERK); p38 mitogen-activated protein kinase (p38); c-Jun N-terminal kinase (JNK); nuclear factor kappa B (NF-κB); tumor necrosis factor α (TNFα); interleukin 1 beta (IL-1β); interleukin 6 (IL-6); interleukin 4 (IL-4); interleukin 10 (IL-10); nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2); Kelch-like ECH-associated protein 1 (keap1); heme oxygenase (HO-1); N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA); NMDA receptor subunit epsilon-2 (NR2B); reactive oxygen species (ROS).

7. NF-κB and Neuropathic Pain

Nuclear factor kappa B (NF-κB) is a pleiotropic protein transcription factor that is activated in response to a wide variety of immune stimuli [180,181]. Recently, numerous papers have indicated an essential role of the NF-κB pathway in pain [21,22,44,59,182–184]. In the central nervous system, NF-κB primarily exists as a p50/p65 heterodimer [180,185,186] and its activation is mediated via two distinct kinase-dependent pathways, classical (canonical) and alternative (noncanonical). For nociception, the classical pathway seems to be the most important since it is initiated by many receptors, including cytokine receptors and TLRs. [187,188].

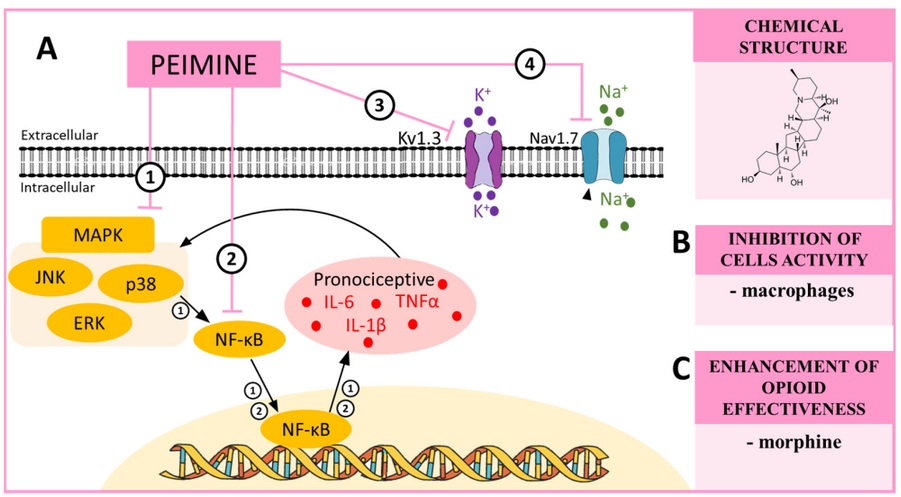
It is currently well established that after nerve damage, activated NF-κB influences the expression of many genes, which contributes to the production of many nociceptive factors [21,119,182,184,189]. Moreover, increased NF-κB activity has been demonstrated not only in the DRGs but also in the spinal cord of various neuropathic pain model animals [21,22,44,182,184,190,191]. Recently, it was also shown that the levels of the pronociceptive factors TNFα and IL-6, which are involved in neuropathic pain development after spinal cord injury, can be decreased by inhibiting the TLR4/MyD88/NF-κB pathway [192]. Similarly, after sciatic nerve injury, the selective inhibition of NF-κB reduces hypersensitivity, which has been shown to be associated with beneficial effects on the levels of the

pronociceptive factors IL-6 and iNOS [182]. Interestingly, repeated intrathecal administration of parthenolide (an NF-κB inhibitor) increases microglial activation after sciatic nerve injury in rats [21], although it provides pain relief and increases the analgesic properties of morphine [21,59]. These surprising results were partly explained by in vitro studies, in which it was shown that parthenolide, apart from activating microglia, reduces the levels of pronociceptive factors produced by M1 microglia (iNOS, IL-1β, IL-18) and increases the levels of antinociceptive factors produced by M2 microglia (TIMP1, IL-10) [21,59]. It is already known that parthenolide directly downregulates NF-κB and probably indirectly modulates p38 and ERK1/2 kinase [21,59]. In conclusion, the available literature indicates that the inhibition of NF-κB may directly or indirectly alleviate neuropathic pain symptoms and promote neuroprotective microglial M2 polarization.

8. PEIMINE—A MAPK and NF-κB Modulator in Neuropathic Pain

A very interesting substance in terms of its potential analgesic effect and its ability to targets MAPKs and NF-κB is peimine. It is a natural compound that belongs to a class of substances known as amaryllidaceae alkaloids. It is primarily found in plants of the Amaryllidaceae family, such as the Chinese herb *Fritillaria thunbergii* [193]. This substance has been studied for its various biological activities, including its anti-inflammatory, antioxidant, antitumor, and antiviral properties [194]. It has been shown that peimine is able to inhibit both the growth of cancer cells and inflammation in animal models [195,196]. In Chinese medicine, it has been claimed to promote lung infection recovery, reduce phlegm, and relieve cough symptoms [194]. There are only a few studies on the pain-relieving effects of this compound. It was shown that peimine inhibits the writhing reaction induced by acetic acid in mice [197] and strongly reduces hypersensitivity to mechanical and thermal stimuli in mice after sciatic nerve injury [90]. Moreover, the administration of peimine with opioids resulted in more effective attenuation of tactile hypersensitivity in the case of morphine and oxycodone, while thermal hypersensitivity was more effectively reduced in the case of administration with morphine or buprenorphine [90]. The mechanism of the analgesic action of peimine in neuropathic pain has not yet been fully elucidated but it may be related to its beneficial effect on MAPKs and NF-κB. Moreover, emerging studies of peimines conducted in vitro indicate a very broad spectrum of activity. It has been shown that this substance can not only block the Nav1.7 ion channel but also preferentially inhibit the Kv1.3 ion channel [93], which are channels closely involved in nociceptive transmission. It was also recently pointed out that peimine targets nAChRs with high affinity, which might account for its anti-inflammatory actions [198]. The in vitro experiments performed on chondrocytes provide evidence that peimine can inhibit the IL-1β-induced activation of MAPK [91]. Moreover, a study on human mast cells proved that peimine reduced MAPK phosphorylation, downregulated nuclear NF-κB expression, and consequently inhibited the production of pronociceptive cytokines such as IL-6, IL-8, and TNFα [195]. Peimine significantly inhibits the phosphorylation of p38, ERK and JNK and decreases p65 and IκB in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages [92]. The suggested mechanisms of action of peimine are presented in brief in Scheme 3. Notably, the pharmacokinetics of peimine are sex-dependent; this drug is slowly eliminated from the plasma of male but not female Sprague–Dawley rats, and there are also substantial gender-related differences in pharmacokinetic parameters [194].

Undoubtedly, further research on peimine is needed to assess its usefulness in the treatment of neuropathic pain; however, according to the latest reports, this substance may have a toxic effect on the heart [194]. Importantly, we do not know whether the doses of peimine that could produce an analgesic effect will cause any side effects. At this point, this substance has enormous therapeutic potential that needs to be further explored.



Scheme 3. (**A**) **The possible mechanisms of peimine action as indicated by various *in vitro* ①②③④ studies:** ① inhibition of MAP kinases by peimine, which in turn inhibits NF-κB, and, as a consequence, the production of pronociceptive cytokines such as IL-6 or IL-1β [91]; ② inhibitory effects of NF-κB, which causes a decrease in the synthesis of pronociceptive factors [195]; ③ inhibition of the Kv1.3 potassium channels, which are involved in the maintenance of persistent pain [93]; ④ inhibition of the Nav1.7 sodium channels, which are involved in the development of hypersensitivity [93]. (**B**) **The influence of peimine on the activation of cells important for neuropathic pain development as proposed by *in vitro* studies** [199]; and (**C**) **the influence of peimine on opioid effectiveness in neuropathic pain models** [90]. ***Abbreviations:*** mitogen-activated protein kinases (MAPK); extracellular signal-regulated kinase (ERK); p38 mitogen-activated protein kinase (p38); c-Jun N-terminal kinase (JNK); nuclear factor kappa B (NF-κB); tumor necrosis factor α (TNFα); interleukin 1 beta (IL-1β); interleukin 6 (IL-6).

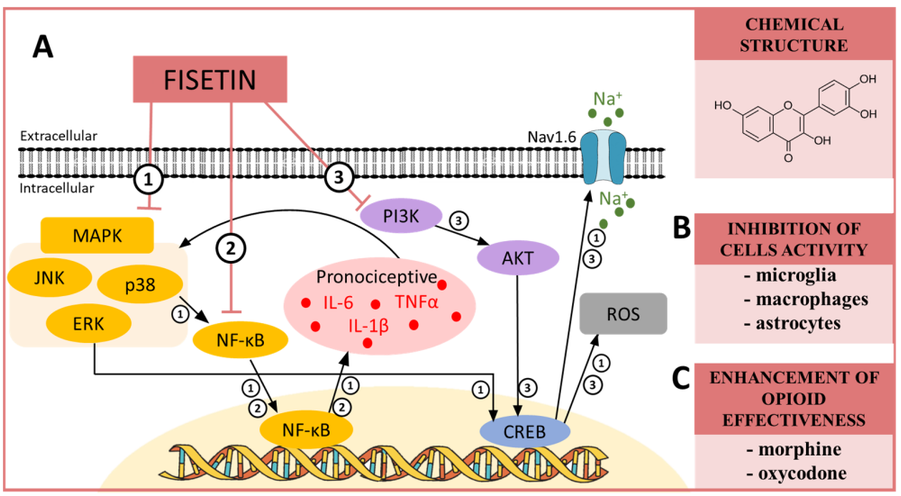
9. PI3K/AKT and Neuropathic Pain

Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) is a lipid kinase that modulates cell differentiation, proliferation, migration, and death by activating the downstream target protein kinase B, known as AKT [200,201]. Importantly, disorders in the functioning of the PI3K/AKT pathway have already been demonstrated in many diseases, including cancer, diabetes, cardiovascular diseases and neurological diseases [202]. Research conducted over the years shows that PI3K is closely involved in long-term potentiation of synaptic plasticity [203–205], while more recent studies clearly suggest its important role in nociceptive transmission [206–210]. Evidence indicates that PI3K and AKT are crucial mediators that lead to the activation of NF-κB, which plays an important role in the production of nociceptive factors (e.g., IL-1β, TNFα) in neuropathic pain [211]. Several pharmacological studies have indicated that the blockade of PI3K reduces hypersensitivity in animal pain models of inflammatory and neuropathic pain [206,207,209,212,213]. Intrathecal injection of PI3K and AKT inhibitors (wortmannin, LY294002, deguelin) started before L5 spinal nerve ligation reduced mechanical and thermal hypersensitivity in rats [207]. There are also reports showing that repeated treatment with LY294002 attenuates hypersensitivity in rats with painful diabetic neuropathy [214]. Surprisingly, after sciatic nerve injury in mice, it was shown that a single intrathecal administration of a selective PI3K activator, namely, 740 Y-P, decreased mechanical and thermal hypersensitivity on day 7 [90]. Moreover, single intrathecal administration of 740 Y-P combined with opioids (morphine, buprenorphine, oxycodone) relieves thermal, but not mechanical, hypersensitivity [90]. Further research is required to explain the molecular mechanism of the observed effects and the above-discussed discrepancies in the literature. In vitro studies have shown that the inhibition of the LPS-activated PI3K/AKT pathway in microglia diminishes the biosynthesis of pronociceptive factors [215,216]. Additionally, it was also shown that PI3K influences the

morphine-induced migration of microglia [217]. Taking into account the available studies in the literature, it can be said with certainty that the role of the PI3K/AKT pathway in the central nervous system is ambiguous and appears to be dualistic. For example, after spinal cord injury, its activation prevents oxidative stress, inflammation and cell death, while its inhibition prevents the formation of glial scars [218]. The roles and mechanism of action of the PI3K/Akt pathway in the development of neuropathic pain evoked by nerve or spinal cord injury and diabetes, and its involvement in opioid treatment effectiveness, still need to be explained since the literature clearly suggests that this pathway has therapeutic potential.

10. FISETIN—A MAPK, NF-κB and PI3K Modulator in Neuropathic Pain

Fisetin, a substance with wide therapeutic potential, which includes effects on MAPK, NF-κB and PI3K, is a naturally occurring flavonoid compound found in various fruits and vegetables such as strawberries, apples, and onions [219]. Fisetin administration has been shown to have beneficial effects in preclinical animal models of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, dementia, schizophrenia, stroke, traumatic brain injury, and the aging process [220–226]. This substance evokes a variety of pharmacological effects, such as anti-allergic, cancer-preventive and neuroprotective actions [227–229]. In 2015, it was shown that fisetin administration after oral drug treatment relieved thermal hypersensitivity in mice exposed to sciatic nerve injury. Importantly, this effect was a reversing action (not a prophylactic one) since the administrations started two weeks following injury, which is when pain-related behavior was observed. In this study, however, a reduction in mechanical hypersensitivity was not observed [98]. Interestingly, subsequent studies showed that after the intrathecal administration of fisetin in mice post sciatic nerve injury, both thermal and mechanical hypersensitivity were significantly reduced, and fisetin also improved the analgesic effect of morphine or oxycodone [90]. It was also confirmed by others that fisetin oral administration can delay diabetic neuropathic pain-related behavior in mice [99]. Although this chronic administration of fisetin did not affect the symptoms of hyperglycemia in diabetic mice, it reduced severe oxidative stress in the spinal cord, DRGs, and sciatic nerve. The analgesic properties of fisetin can be explained not only by the beneficial effect of this substance on MAPK, NF-κB and PI3K but also by its influence on the monoaminergic system. The use of a 5HT7 antagonist abolished the effect caused by fisetin, and the administration of a serotonin precursor enhanced it [98]. Moreover, fisetin reduced the depressive and anxiety symptoms that co-occurred with neuropathic pain [98]. It was also shown that the blockade of spinal GABAA receptors by bicuculline completely counteracted fisetin analgesia, so these receptors are probably an indirect target for this substance [99]. There are also data from studies conducted in a model of diabetic neuropathy in rats showing that the oral administration of fisetin alleviated hypersensitivity, which is associated with reduced levels of NF-κB and is probably a consequence of pronociceptive IL-6 and TNFα [100]. Moreover, it has also been determined that fisetin positively modulates the activity of microglia; in vitro studies have shown that this substance inhibits the expression of iNOS, and, as a consequence, the production of NO and IL-1β; the regulatory molecular mechanism of fisetin-induced HO-1 expression operates through the PI3K/AKT and p38 signaling pathways [94]. The suggested factors important in nociception affected by fisetin are presented in brief in Scheme 4. Importantly, the latest data suggest that fisetin may have a positive effect on other states that may result in neuropathic pain development; for example, an in vitro study showed that this substance acts as a growth inhibitor of human oral squamous cell carcinoma [230]. Additionally, there are also reports which indicate that fisetin exerts antihyperlipidemic [231] and antidiabetic [232] properties. Understanding the molecular mechanisms of fisetin is essential to develop new, safe, and effective strategies for the treatment of neuropathic pain. The improvement in the effectiveness of opioid treatment after combined administration with fisetin, demonstrated in experimental studies, opens new possibilities for combined therapy.



Scheme 4. (**A**) **The possible mechanisms of fisetin action as indicated by various *in vivo* ①② and *in vitro* ③ studies:** ① inhibition of MAP kinases by fisetin, which in turn indirectly inhibits NF-κB, and, as a consequence, the production of pronociceptive cytokines, such as IL-6, IL-1β and TNFα [100], is lowered;② influence on NF-κB activation, which causes a decrease in the synthesis of pronociceptive factors [97]; ③ inhibition of PI3K/AKT, which in turn influence the cAMP-response element binding protein (CREB) that impacts the expression of Nav1.6 sodium channels, which reduces hypersensitivity but also decreases the production of ROS, which are confirmed to be responsible for the maintenance of neuropathic pain [61,96,233]. (**B**) **The influence of fisetin on the activation of cells important for neuropathic pain development as proposed by *in vitro* studies** [94,234]; and (**C**) **the influence of fisetin on opioid effectiveness in neuropathic pain model** [90]. ***Abbreviations:*** mitogen-activated protein kinases (MAPK); extracellular signal-regulated kinase (ERK); p38 mitogen-activated protein kinase (p38); c-Jun N-terminal kinase (JNK); nuclear factor kappa B (NF-κB); tumor necrosis factor α (TNFα); interleukin 1 beta (IL-1β); interleukin 6 (IL-6); reactive oxygen species (ROS); phosphoinositide 3-kinase (PI3K); protein kinase B (AKT); cAMP response element-binding protein (CREB).

11. Conclusions

The research on the selected multitarget substances discussed above indicates that both MAPKs and factors such as NRF2, NF-κB, PI3K and MMP9 may become important targets for future neuropathic pain therapies. This notion is supported by pharmacological studies conducted with animal neuropathic pain models using selective and nonselective pharmacological tools. Further research is clearly needed, as the modulation of intracellular pathways underlying many pathophysiological processes may also improve the effectiveness of analgesics that are already in clinical use. In our opinion, neuropathic pain therapy should be based on nonselective drugs with a broad spectrum of action, which, by partially inhibiting selected intracellular pathways strongly activated in neuropathy, will be able to at least partially restore homeostasis. In our opinion, such valuable substances include minocycline, astaxanthin, fisetin, and peimine, which were considered to be effective in pain relief in behavioral studies; their beneficial properties result from their wide spectrum of action, among others, on various intracellular pathways. Importantly, these substances exert suitable analgesic properties in neuropathy models of various etiologies and are also relatively safe for patients because some are already used in the clinic, not to relieve pain, but, for example, in the case of minocycline. in the treatment of bacterial infections, acne, or rheumatoid arthritis. Formulations containing fisetin or astaxanthin are also broadly available to buy as dietary supplements with antioxidant properties. It is worth emphasizing that the results of behavioral tests also suggest their usefulness in therapy combined with opioid drugs, the effectiveness of which decreases under neuropathic pain. We believe that future research on these compounds should focus on a detailed understanding of the

mechanisms of action of these substances, particularly in the context of gender differences in different phases of neuropathic pain. Moreover, these studies, conducted on various neuropathy models, should also take into account the ability of these substances to alleviate neuropathic pain comorbidities (e.g., metabolic, autoimmune, viral or cancer diseases). Overall, a detailed understanding of the pharmacokinetic profile and the impact of these compounds on pathophysiological processes may contribute to the development of precise and effective treatments for neuropathic pain, taking into account the individual condition of patients.

Author Contributions: Conceptualization, K.C. and J.M.; writing—original draft preparation, K.C. and J.M.; writing—review and editing, K.C. and J.M.; visualization K.C. and J.M.; supervision, J.M.; project administration, J.M.; funding acquisition, J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Science Centre, Poland grants, OPUS 22 2021/43/B/NZ7/00230 and statutory funds from the Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing is not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Schembri, E. Are Opioids Effective in Relieving Neuropathic Pain? *SN Compr. Clin. Med.* **2019**, *1*, 30–46. [CrossRef]
2. Van Hecke, O.; Austin, S.K.; Khan, R.A.; Smith, B.H.; Torrance, N. Neuropathic Pain in the General Population: A Systematic Review of Epidemiological Studies. *Pain* **2014**, *155*, 654–662. [CrossRef]
3. Colloca, L.; Ludman, T.; Bouhassira, D.; Baron, R.; Dickenson, A.H.; Yarnitsky, D.; Freeman, R.; Truini, A.; Attal, N.; Finnerup, N.B.; et al. Neuropathic Pain. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2017**, *3*, 17002. [CrossRef] [PubMed]
4. Fallon, M.T. Neuropathic Pain in Cancer. *Br. J. Anaesth.* **2013**, *111*, 105–111. [CrossRef] [PubMed]
5. Ji, R.R.; Baba, H.; Brenner, G.J.; Woolf, C.J. Nociceptive-Specific Activation of ERK in Spinal Neurons Contributes to Pain Hypersensitivity. *Nat. Neurosci.* **1999**, *2*, 1114–1119. [CrossRef] [PubMed]
6. Ji, R.R.; Samad, T.A.; Jin, S.X.; Schmoll, R.; Woolf, C.J. p38 MAPK Activation by NGF in Primary Sensory Neurons after Inflammation Increases TRPV1 Levels and Maintains Heat Hyperalgesia. *Neuron* **2002**, *36*, 57–68. [CrossRef]
7. Zhuang, Z.-Y.; Wen, Y.-R.; Zhang, D.-R.; Borsello, T.; Bonny, C.; Strichartz, G.R.; Decosterd, I.; Ji, R.-R. A Peptide C-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Inhibitor Blocks Mechanical Allodynia after Spinal Nerve Ligation: Respective Roles of JNK Activation in Primary Sensory Neurons and Spinal Astrocytes for Neuropathic Pain Development and Maintenance. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 3551–3560. [CrossRef]
8. Xu, Z.; Wang, B.-R.; Wang, X.; Kuang, F.; Duan, X.-L.; Jiao, X.-Y.; Ju, G. ERK1/2 and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Mediate INOS-Induced Spinal Neuron Degeneration after Acute Traumatic Spinal Cord Injury. *Life Sci.* **2006**, *79*, 1895–1905. [CrossRef]
9. Karim, F.; Wang, C.C.; Gereau, R.W. Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes 1 and 5 Are Activators of Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Required for Inflammatory Pain in Mice. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 3771–3779. [CrossRef]
10. Pezet, S.; Malcangio, M.; Lever, I.J.; Perkinton, M.S.; Thompson, S.W.N.; Williams, R.J.; McMahon, S.B. Noxious Stimulation Induces Trk Receptor and Downstream ERK Phosphorylation in Spinal Dorsal Horn. *Mol. Cell. Neurosci.* **2002**, *21*, 684–695. [CrossRef]
11. Hains, B.C.; Waxman, S.G. Activated Microglia Contribute to the Maintenance of Chronic Pain after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 4308–4317. [CrossRef] [PubMed]
12. Ji, R.-R.; Suter, M.R. p38 MAPK, Microglial Signaling, and Neuropathic Pain. *Mol. Pain* **2007**, *3*, 33. [CrossRef] [PubMed]
13. Ma, W.; Quirion, R. Partial Sciatic Nerve Ligation Induces Increase in the Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) and c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) in Astrocytes in the Lumbar Spinal Dorsal Horn and the Gracile Nucleus. *Pain* **2002**, *99*, 175–184. [CrossRef]
14. Ma, W.; Quirion, R. The ERK/MAPK Pathway, as a Target for the Treatment of Neuropathic Pain. *Expert Opin. Ther. Targets* **2005**, *9*, 699–713. [CrossRef] [PubMed]
15. Tsuda, M.; Mizokoshi, A.; Shigemoto-Mogami, Y.; Koizumi, S.; Inoue, K. Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Spinal Hyperactive Microglia Contributes to Pain Hypersensitivity Following Peripheral Nerve Injury. *Glia* **2004**, *45*, 89–95. [CrossRef] [PubMed]

16. Zhuang, Z.Y.; Gerner, P.; Woolf, C.J.; Ji, R.R. ERK Is Sequentially Activated in Neurons, Microglia, and Astrocytes by Spinal Nerve Ligation and Contributes to Mechanical Allodynia in This Neuropathic Pain Model. *Pain* **2005**, *114*, 149–159. [CrossRef]
17. Morrison, D.K. MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a011254. [CrossRef]
18. Pearson, G.; Robinson, F.; Beers Gibson, T.; Xu, B.; Karandikar, M.; Berman, K.; Cobb, M.H. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways:Regulation and Physiological Functions. *Endocr. Rev.* **2001**, *22*, 153–183. [CrossRef]
19. Jin, S.-X.; Zhuang, Z.-Y.; Woolf, C.J.; Ji, R.-R. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Activated After a Spinal Nerve Ligation in Spinal Cord Microglia and Dorsal Root Ganglion Neurons and Contributes to the Generation of Neuropathic Pain. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 4017–4022. [CrossRef]
20. Zhou, T.T.; Wu, J.R.; Chen, Z.Y.; Liu, Z.X.; Miao, B. Effects of Dexmedetomidine on P2X4Rs, p38-MAPK and BDNF in Spinal Microglia in Rats with Spared Nerve Injury. *Brain Res.* **2014**, *1568*, 21–30. [CrossRef]
21. Popiolek-Barczyk, K.; Kolosowska, N.; Piotrowska, A.; Makuch, W.; Rojewska, E.; Jurga, A.M.; Pilat, D.; Mika, J. Parthenolide Relieves Pain and Promotes M2 Microglia/Macrophage Polarization in Rat Model of Neuropathy. *Neural Plast.* **2015**, *2015*, 676473. [CrossRef]
22. Rojewska, E.; Popiolek-Barczyk, K.; Kolosowska, N.; Piotrowska, A.; Zychowska, M.; Makuch, W.; Przewlocka, B.M.J. PD98059 Influences Immune Factors and Enhances Opioid Analgesia in Model of Neuropathy. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138583. [CrossRef]
23. Zhou, X.; Cheng, H.; Xu, D.; Yin, Q.; Cheng, L.; Wang, L.; Song, S.; Zhang, M. Attenuation of Neuropathic Pain by Saikosaponin a in a Rat Model of Chronic Constriction Injury. *Neurochem. Res.* **2014**, *39*, 2136–2142. [CrossRef]
24. Wen, Y.R.; Suter, M.R.; Kawasaki, Y.; Huang, J.; Pertin, M.; Kohno, T.; Berde, C.B.; Decosterd, I.; Ji, R.R. Nerve Conduction Blockade in the Sciatic Nerve Prevents but Does Not Reverse the Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Spinal Microglia in the Rat Spared Nerve Injury Model. *Anesthesiology* **2007**, *107*, 312–321. [CrossRef] [PubMed]
25. Taves, S.; Berta, T.; Liu, D.L.; Gan, S.; Chen, G.; Kim, Y.H.; Van de Ven, T.; Laufer, S.; Ji, R.R. Spinal Inhibition of p38 MAP Kinase Reduces Inflammatory and Neuropathic Pain in Male but Not Female Mice: Sex-Dependent Microglial Signaling in the Spinal Cord. *Brain. Behav. Immun.* **2016**, *55*, 70–81. [CrossRef]
26. Rojewska, E.; Popiolek-Barczyk, K.; Jurga, A.M.; Makuch, W.; Przewlocka, B.; Mika, J. Involvement of Pro- and Antinociceptive Factors in Minocycline Analgesia in Rat Neuropathic Pain Model. *J. Neuroimmunol.* **2014**, *277*, 57–66. [CrossRef]
27. Chen, L.; Wang, H.; Xing, J.; Shi, X.; Huang, H.; Huang, J.; Xu, C.; Chen, L.; Wang, H.; Xing, J.; et al. Silencing P2X7R Alleviates Diabetic Neuropathic Pain Involving TRPV1 via PKCε/p38MAPK/NF-κB Signaling Pathway in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14141. [CrossRef] [PubMed]
28. Milligan, E.D.; Twining, C.; Chacur, M.; Biedenkapp, J.; O'Connor, K.; Poole, S.; Tracey, K.; Martin, D.; Maier, S.F.; Watkins, L.R. Spinal Glia and Proinflammatory Cytokines Mediate Mirror-Image Neuropathic Pain in Rats. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 1026. [CrossRef] [PubMed]
29. Gilhotra, N.; Sharma, A.; Singh, M.; Dhingra, D. Involvement of p38 MAPkinase in Attenuation of Antinociceptive Effect of Morphine in Diabetic Mice. *Indian J. Exp. Biol.* **2007**, *45*, 654–656.
30. Wang, Z.; Chabot, J.G.; Quirion, R. On the Possible Role of ERK, p38 and CaMKII in the Regulation of CGRP Expression in Morphine-Tolerant Rats. *Mol. Pain* **2011**, *7*, 1744–8069. [CrossRef] [PubMed]
31. Sweitzer, S.M.; Medicherla, S.; Almirez, R.; Dugar, S.; Chakravarty, S.; Shumilla, J.A.; Yeomans, D.C.; Protter, A.A. Antinociceptive Action of a p38alpha MAPK Inhibitor, SD-282, in a Diabetic Neuropathy Model. *Pain* **2004**, *109*, 409–419. [CrossRef] [PubMed]
32. Anand, P.; Shenoy, R.; Palmer, J.E.; Baines, A.J.; Lai, R.Y.K.; Robertson, J.; Bird, N.; Ostenfeld, T.; Chizh, B.A. Clinical Trial of the p38 MAP Kinase Inhibitor Dilmapimod in Neuropathic Pain Following Nerve Injury. *Eur. J. Pain* **2011**, *15*, 1040–1048. [CrossRef] [PubMed]
33. Ostenfeld, T.; Krishen, A.; Lai, R.Y.; Bullman, J.; Green, J.; Anand, P.; Scholz, J.; Kelly, M. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of the Analgesic Efficacy and Safety of the p38 MAP Kinase Inhibitor, Losmapimod, in Patients with Neuropathic Pain from Lumbosacral Radiculopathy. *Clin. J. Pain* **2015**, *31*, 283–293. [CrossRef] [PubMed]
34. Willemen, H.L.D.M.; Campos, P.M.; Lucas, E.; Morreale, A.; GIL-Redondo, R.; Agut, J.; González, F.V.; Ramos, P.; Heijnen, C.; Mayor, F.; et al. A Novel p38 MAPK Docking Groove-Targeted Compound Is a Potent Inhibitor of Inflammatory Hyperalgesia. *Biochem. J.* **2014**, *459*, 427. [CrossRef]
35. Visseq, A.; Descheemaeker, A.; Pinto-Pardo, N.; Nauton, L.; Théry, V.; Giraud, F.; Abrunhosa-Thomas, I.; Artola, A.; Anizon, F.; Dallel, R.; et al. Pyridin-2(1H)One Derivatives: A Possible New Class of Therapeutics for Mechanical Allodynia. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *187*, 111917. [CrossRef]
36. Svensson, C.I.; Hua, X.-Y.; Protter, A.A.; Powell, H.C.; Yaksh, T.L. Spinal p38 MAP Kinase Is Necessary for NMDA-Induced Spinal PGE(2) Release and Thermal Hyperalgesia. *NeuroReport* **2003**, *14*, 1153–1157. [CrossRef]
37. Cui, Y.; Liao, X.X.; Liu, W.; Guo, R.X.; Wu, Z.Z.; Zhao, C.M.; Chen, P.X.; Feng, J.Q. A Novel Role of Minocycline: Attenuating Morphine Antinociceptive Tolerance by Inhibition of p38 MAPK in the Activated Spinal Microglia. *Brain. Behav. Immun.* **2008**, *22*, 114–123. [CrossRef]
38. Zhuang, Z.Y.; Kawasaki, Y.; Tan, P.H.; Wen, Y.R.; Huang, J.; Ji, R.R. Role of the CX3CR1/p38 MAPK Pathway in Spinal Microglia for the Development of Neuropathic Pain Following Nerve Injury-Induced Cleavage of Fractalkine. *Brain. Behav. Immun.* **2007**, *21*, 642–651. [CrossRef]
39. Kumar, S.; Boehm, J.; Lee, J.C. p38 MAP Kinases: Key Signalling Molecules as Therapeutic Targets for Inflammatory Diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 717–726. [CrossRef]

40. Sung, C.-S.; Wen, Z.-H.; Chang, W.-K.; Chan, K.-H.; Ho, S.-T.; Tsai, S.-K.; Chang, Y.-C.; Wong, C.-S. Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Attenuates Interleukin-1beta-Induced Thermal Hyperalgesia and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in the Spinal Cord. *J. Neurochem.* **2005**, *94*, 742–752. [CrossRef]
41. Mei, X.-P.; Sakuma, Y.; Xie, C.; Wu, D.; Ho, I.; Kotani, J.; Xu, L.-X. Depressing Interleukin-1β Contributed to the Synergistic Effects of Tramadol and Minocycline on Spinal Nerve Ligation-Induced Neuropathic Pain. *Neurosignals.* **2013**, *710032*, 30–42. [CrossRef]
42. Piotrowska, A.; Popiolek-Barczyk, K.; Pavone, F.; Mika, J. Comparison of the Expression Changes after Botulinum Toxin Type A and Minocycline Administration in Lipopolysaccharide-Stimulated Rat Microglial and Astroglial Cultures. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 141. [CrossRef] [PubMed]
43. Raghavendra, V.; Tanga, F.; Deleo, J.A. Inhibition of Microglial Activation Attenuates the Development but Not Existing Hypersensitivity in a Rat Model of Neuropathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *306*, 624–630. [CrossRef]
44. Miyoshi, K.; Obata, K.; Kondo, T.; Okamura, H.; Noguchi, K. Interleukin-18-Mediated Microglia/Astrocyte Interaction in the Spinal Cord Enhances Neuropathic Pain Processing after Nerve Injury. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 12775–12787. [CrossRef]
45. Daigo, E.; Sakuma, Y.; Miyoshi, K.; Noguchi, K.; Kotani, J. Increased Expression of Interleukin-18 in the Trigeminal Spinal Subnucleus Caudalis after Inferior Alveolar Nerve Injury in the Rat. *Neurosci. Lett.* **2012**, *529*, 39–44. [CrossRef] [PubMed]
46. Austin, P.J.; Moalem-Taylor, G. The Neuro-Immune Balance in Neuropathic Pain: Involvement of Inflammatory Immune Cells, Immune-like Glial Cells and Cytokines. *J. Neuroimmunol.* **2010**, *229*, 26–50. [CrossRef]
47. Pilat, D.; Piotrowska, A.; Rojewska, E.; Jurga, A.; Ślusarczyk, J.; Makuch, W.; Basta-Kaim, A.; Przewlocka, B.; Mika, J. Blockade of IL-18 Signaling Diminished Neuropathic Pain and Enhanced the Efficacy of Morphine and Buprenorphine. *Mol. Cell. Neurosci.* **2016**, *71*, 114–124. [CrossRef]
48. Pilat, D.; Rojewska, E.; Jurga, A.M.; Piotrowska, A.; Makuch, W.; Przewlocka, B.; Mika, J. IL-1 Receptor Antagonist Improves Morphine and Buprenorphine Efficacy in a Rat Neuropathic Pain Model. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *764*, 240–248. [CrossRef]
49. Ren, K.; Dubner, R. Neuron-Glia Crosstalk Gets Serious: Role in Pain Hypersensitivity. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **2008**, *21*, 570. [CrossRef]
50. Bouhassira, D. Neuropathic Pain: Definition, Assessment and Epidemiology. *Rev. Neurol.* **2019**, *175*, 16–25. [CrossRef]
51. Bading, H.; Greenberg, M.E. Stimulation of Protein Tyrosine Phosphorylation by NMDA Receptor Activation. *Science* **1991**, *253*, 912–914. [CrossRef] [PubMed]
52. Fiore, R.S.; Murphy, T.H.; Sanghera, J.S.; Pelech, S.L.; Baraban, J.M. Activation of P42 Mitogen-Activated Protein Kinase by Glutamate Receptor Stimulation in Rat Primary Cortical Cultures. *J. Neurochem.* **1993**, *61*, 1626–1633. [CrossRef] [PubMed]
53. Rosen, L.B.; Ginty, D.D.; Weber, M.J.; Greenberg, M.E. Membrane Depolarization and Calcium Influx Stimulate MEK and MAP Kinase via Activation of Ras. *Neuron* **1994**, *12*, 1207–1221. [CrossRef] [PubMed]
54. Slusarczyk, J.; Trojan, E.; Glombik, K.; Piotrowska, A.; Budziszewska, B.; Kubera, M.; Popiolek-Barczyk, K.; Lason, W.; Mika, J.; Basta-Kaim, A. Anti-Inflammatory Properties of Tianeptine on Lipopolysaccharide-Induced Changes in Microglial Cells Involve Toll-like Receptor-Related Pathways. *J. Neurochem.* **2015**, *136*, 958–970. [CrossRef]
55. Morozov, A.; Muzzio, I.A.; Bourtchouladze, R.; Van-Strien, N.; Lapidus, K.; Yin, D.; Winder, D.G.; Adams, J.P.; Sweatt, J.D.; Kandel, E.R. Rap1 Couples CAMP Signaling to a Distinct Pool of P42/44MAPK Regulating Excitability, Synaptic Plasticity, Learning, and Memory. *Neuron* **2003**, *39*, 309–325. [CrossRef]
56. Fitzgerald, E.M. Regulation of Voltage-Dependent Calcium Channels in Rat Sensory Neurones Involves a Ras—Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *J. Physiol.* **2000**, *527*, 433–444. [CrossRef]
57. Han, M.; Huang, R.-Y.; Du, Y.-M.; Zhao, Z.-Q.; Zhang, Y.-Q. Early Intervention of ERK Activation in the Spinal Cord Can Block Initiation of Peripheral Nerve Injury-Induced Neuropathic Pain in Rats. *Sheng Li Xue Bao* **2011**, *63*, 106–114.
58. Dai, Z.K.; Lin, T.C.; Liou, J.C.; Cheng, K.I.; Chen, J.Y.; Chu, L.W.; Chen, I.J.; Wu, B.N. Xanthine Derivative KMUP-1 Reduces Inflammation and Hyperalgesia in a Bilateral Chronic Constriction Injury Model by Suppressing MAPK and NF-κB Activation. *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 1621–1631. [CrossRef]
59. Popiolek-Barczyk, K.; Makuch, W.; Rojewska, E.; Pilat, D.; Mika, J. Inhibition of Intracellular Signaling Pathways NF-κB and MEK1/2 Attenuates Neuropathic Pain Development and Enhances Morphine Analgesia. *Pharmacol. Rep.* **2014**, *66*, 845–851. [CrossRef]
60. Ciruela, A.; Dixon, A.K.; Bramwell, S.; Gonzalez, M.I.; Pinnock, R.D.; Lee, K. Identification of MEK1 as a Novel Target for the Treatment of Neuropathic Pain. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *138*, 751–756. [CrossRef]
61. Shao, J.; Yu, W.; Wei, W.; Wang, S.; Zheng, Z.; Li, L.; Sun, Y.; Zhang, J.; Li, Z.; Ren, X.; et al. MAPK-ERK-CREB Signaling Pathway Upregulates Nav1.6 in Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain in the Rat. *Toxicol. Lett.* **2023**, *384*, 149–160. [CrossRef]
62. Sanna, M.D.; Manassero, G.; Vercelli, A.; Herdegen, T.; Galeotti, N. The Isoform-Specific Functions of the c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) in a Mouse Model of Antiretroviral-Induced Painful Peripheral Neuropathy. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**, *880*, 173161. [CrossRef]
63. Wang, J.; Van De Water, T.R.; Bonny, C.; De Ribaupierre, F.; Puel, J.L.; Zine, A. A Peptide Inhibitor of C-Jun N-Terminal Kinase Protects against Both Aminoglycoside and Acoustic Trauma-Induced Auditory Hair Cell Death and Hearing Loss. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 8596–8607. [CrossRef]
64. Tezel, G.; Yang, X.; Yang, J.; Wax, M.B. Role of Tumor Necrosis Factor Receptor-1 in the Death of Retinal Ganglion Cells Following Optic Nerve Crush Injury in Mice. *Brain Res.* **2004**, *996*, 202–212. [CrossRef]
65. Yamasaki, T.; Kawasaki, H.; Nishina, H. Diverse Roles of JNK and MKK Pathways in the Brain. *J. Signal Transduct.* **2012**, *2012*, 459265. [CrossRef] [PubMed]

66. Ip, Y.T.; Davis, R.J. Signal Transduction by the C-Jun N-Terminal Kinase (JNK)—From Inflammation to Development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10*, 205–219. [CrossRef] [PubMed]
67. Borsello, T.; Clarkel, P.G.H.; Hirt, L.; Vercelli, A.; Repici, M.; Schorderet, D.F.; Bogousslavsky, J.; Bonny, C. A Peptide Inhibitor of C-Jun N-Terminal Kinase Protects against Excitotoxicity and Cerebral Ischemia. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 1180–1186. [CrossRef] [PubMed]
68. Tang, J.; Zhu, C.; Li, Z.; Liu, X.; Sun, S.; Zhang, T.; Luo, Z.; Zhang, H.; Li, W. Inhibition of the Spinal Astrocytic JNK/MCP-1 Pathway Activation Correlates with the Analgesic Effects of Tanshinone IIA Sulfonate in Neuropathic Pain. *J. Neuroinflammation* **2015**, *12*, 57. [CrossRef] [PubMed]
69. Sanna, M.D.; Ghelardini, C.; Galeotti, N. Blockade of the Spinal BDNF-Activated JNK Pathway Prevents the Development of Antiretroviral-Induced Neuropathic Pain. *Neuropharmacology* **2016**, *105*, 543–552. [CrossRef] [PubMed]
70. Mei, X.P.; Xu, H.; Xie, C.; Ren, J.; Zhou, Y.; Zhang, H.; Xu, L.X. Post-Injury Administration of Minocycline: An Effective Treatment for Nerve-Injury Induced Neuropathic Pain. *Neurosci. Res.* **2011**, *70*, 305–312. [CrossRef]
71. Hua, X.Y.; Svensson, C.I.; Matsui, T.; Fitzsimmons, B.; Yaksh, T.L.; Webb, M. Intrathecal Minocycline Attenuates Peripheral Inflammation-Induced Hyperalgesia by Inhibiting p38 MAPK in Spinal Microglia. *Eur. J. Neurosci.* **2005**, *22*, 2431–2440. [CrossRef] [PubMed]
72. Cho, I.H.; Lee, M.J.; Jang, M.; Gwak, N.G.; Lee, K.Y.; Jung, H.S. Minocycline Markedly Reduces Acute Visceral Nociception via Inhibiting Neuronal ERK Phosphorylation. *Mol. Pain* **2012**, *8*, 13. [CrossRef] [PubMed]
73. Niimi, N.; Kohyama, K.; Matsumoto, Y. Minocycline Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Increasing Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Neuropathology* **2013**, *33*, 612–620. [CrossRef] [PubMed]
74. Mika, J.; Wawrzczak-Bargiela, A.; Osikowicz, M.; Makuch, W.; Przewlocka, B. Attenuation of Morphine Tolerance by Minocycline and Pentoxifylline in Naive and Neuropathic Mice. *Brain Behav. Immun.* **2009**, *23*, 75–84. [CrossRef]
75. Mika, J.; Osikowicz, M.; Makuch, W.; Przewlocka, B. Minocycline and Pentoxifylline Attenuate Allodynia and Hyperalgesia and Potentiate the Effects of Morphine in Rat and Mouse Models of Neuropathic Pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *560*, 142–149. [CrossRef]
76. Mika, J.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Przewlocka, B. Minocycline Reduces the Injury-Induced Expression of Prodynorphin and Pronociceptin in the Dorsal Root Ganglion in a Rat Model of Neuropathic Pain. *Neuroscience* **2010**, *165*, 1420–1428. [CrossRef]
77. Rojewska, E.; Korostynski, M.; Przewlocki, R.; Przewlocka, B.; Mika, J. Expression Profiling of Genes Modulated by Minocycline in a Rat Model of Neuropathic Pain. *Mol. Pain* **2014**, *10*, 47. [CrossRef]
78. Qiao, L.; Tang, Q.; An, Z.; Qi, J. Minocycline Relieves Neuropathic Pain in Rats with Spinal Cord Injury via Activation of Autophagy and Suppression of PI3K/Akt/MTOR Pathway. *J. Pharmacol. Sci.* **2023**, *153*, 12–21. [CrossRef]
79. Sun, J.S.; Yang, Y.J.; Zhang, Y.Z.; Huang, W.; Li, Z.S.; Zhang, Y. Minocycline Attenuates Pain by Inhibiting Spinal Microglia Activation in Diabetic Rats. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 2677–2682. [CrossRef]
80. Zychowska, M.; Rojewska, E.; Kreiner, G.; Nalepa, I.; Przewlocka, B.; Mika, J. Minocycline Influences the Anti-Inflammatory Interleukins and Enhances the Effectiveness of Morphine under Mice Diabetic Neuropathy. *J. Neuroimmunol.* **2013**, *262*, 35–45. [CrossRef]
81. Makuch, W.; Mika, J.; Rojewska, E.; Zychowska, M.; Przewlocka, B. Effects of Selective and Non-Selective Inhibitors of Nitric Oxide Synthase on Morphine- and Endomorphin-1-Induced Analgesia in Acute and Neuropathic Pain in Rats. *Neuropharmacology* **2013**, *75*, 445–457. [CrossRef] [PubMed]
82. Rojewska, E.; Makuch, W.; Przewlocka, B.; Mika, J. Minocycline Prevents Dynorphin-Induced Neurotoxicity during Neuropathic Pain in Rats. *Neuropharmacology* **2014**, *86*, 301–310. [CrossRef]
83. Ciechanowska, A.; Rojewska, E.; Piotrowska, A.; Barut, J.; Pawlik, K.; Ciapała, K.; Kreiner, G.; Mika, J. New Insights into the Analgesic Properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 Axes Modulation under Neuropathic Pain Conditions—Evidence from Animal Studies. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 1058204. [CrossRef] [PubMed]
84. Xu, X.; Fu, S.; Shi, X.; Liu, R. Microglial BDNF, PI3K, and p-ERK in the Spinal Cord Are Suppressed by Pulsed Radiofrequency on Dorsal Root Ganglion to Ease SNI-Induced Neuropathic Pain in Rats. *Pain Res. Manag.* **2019**, *2019*, 5948686. [CrossRef] [PubMed]
85. Zhao, L.; Tao, X.; Song, T. Astaxanthin Alleviates Neuropathic Pain by Inhibiting the MAPKs and NF-κB Pathways. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, *912*, 174575. [CrossRef] [PubMed]
86. Priyadarshini, L.; Aggarwal, A. Astaxanthin Inhibits Cytokines Production and Inflammatory Gene Expression by Suppressing IκB Kinase-Dependent Nuclear Factor KB Activation in Pre and Postpartum Murrah Buffaloes during Different Seasons. *Vet. World* **2018**, *11*, 782–788. [CrossRef]
87. Fakhri, S.; Dargahi, L.; Abbaszadeh, F.; Jorjani, M. Astaxanthin Attenuates Neuroinflammation Contributed to the Neuropathic Pain and Motor Dysfunction Following Compression Spinal Cord Injury. *Brain Res. Bull.* **2018**, *143*, 217–224. [CrossRef]
88. Qu, X.; Zhang, Z.; Hu, W.; Lou, M.; Zhai, B.; Mei, S.; Hu, Z.; Zhang, L.; Liu, D.; Liu, Z.; et al. Attenuation of the Na/K-ATPase/Src/ROS Amplification Signaling Pathway by Astaxanthin Ameliorates Myocardial Cell Oxidative Stress Injury. *Mol. Med. Rep.* **2020**, *22*, 5125–5134. [CrossRef]
89. Sharma, K.; Sharma, D.; Sharma, M.; Sharma, N.; Bidve, P.; Prajapati, N.; Kalia, K.; Tiwari, V. Astaxanthin Ameliorates Behavioral and Biochemical Alterations in In-Vitro and in-Vivo Model of Neuropathic Pain. *Neurosci. Lett.* **2018**, *674*, 162–170. [CrossRef]

90. Ciapała, K.; Rojewska, E.; Pawlik, K.; Ciechanowska, A.; Mika, J. Analgesic Effects of Fisetin, Peimine, Astaxanthin, Artemisinin, Bardoxolone Methyl and 740 Y-P and Their Influence on Opioid Analgesia in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 9000. [CrossRef]
91. Chen, K.; Lv, Z.T.; Zhou, C.H.; Liang, S.; Huang, W.; Wang, Z.G.; Zhu, W.T.; Wang, Y.T.; Jing, X.Z.; Lin, H.; et al. Peimine Suppresses Interleukin-1β-Induced Inflammation via MAPK Downregulation in Chondrocytes. *Int. J. Mol. Med.* **2019**, *43*, 2241–2251. [CrossRef] [PubMed]
92. Yi, P.F.; Wu, Y.C.; Dong, H.B.; Guo, Y.; Wei, Q.; Zhang, C.; Song, Z.; Qin, Q.Q.; Lv, S.; Wu, S.C.; et al. Peimine Impairs Pro-Inflammatory Cytokine Secretion through the Inhibition of the Activation of NF-κB and MAPK in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2013**, *35*, 567–572. [CrossRef] [PubMed]
93. Xu, J.; Zhao, W.; Pan, L.; Zhang, A.; Chen, Q.; Xu, K.; Lu, H.; Chen, Y. Peimine, a Main Active Ingredient of Fritillaria, Exhibits Anti-Inflammatory and Pain Suppression Properties at the Cellular Level. *Fitoterapia* **2016**, *111*, 1–6. [CrossRef] [PubMed]
94. Chuang, J.Y.; Chang, P.C.; Shen, Y.C.; Lin, C.; Tsai, C.F.; Chen, J.H.; Yeh, W.L.; Wu, L.H.; Lin, H.Y.; Liu, Y.S.; et al. Regulatory Effects of Fisetin on Microglial Activation. *Molecules* **2014**, *19*, 8820–8839. [CrossRef]
95. Wang, T.H.; Wang, S.Y.; Wang, X.D.; Jiang, H.Q.; Yang, Y.Q.; Wang, Y.; Cheng, J.L.; Zhang, C.T.; Liang, W.W.; Feng, H.L. Fisetin Exerts Antioxidant and Neuroprotective Effects in Multiple Mutant HSOD1 Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis by Activating ERK. *Neuroscience* **2018**, *379*, 152–166. [CrossRef]
96. Hassan, S.S.U.; Samanta, S.; Dash, R.; Karpiński, T.M.; Habibi, E.; Sadiq, A.; Ahmadi, A.; Bungau, S. The Neuroprotective Effects of Fisetin, a Natural Flavonoid in Neurodegenerative Diseases: Focus on the Role of Oxidative Stress. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 1015835. [CrossRef]
97. Ren, Q.; Guo, F.; Tao, S.; Huang, R.; Ma, L.; Fu, P. Flavonoid Fisetin Alleviates Kidney Inflammation and Apoptosis via Inhibiting Src-Mediated NF-κB P65 and MAPK Signaling Pathways in Septic AKI Mice. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *122*, 109772. [CrossRef]
98. Zhao, X.; Wang, C.; Cui, W.G.; Ma, Q.; Zhou, W.H. Fisetin Exerts Antihyperalgesic Effect in a Mouse Model of Neuropathic Pain: Engagement of Spinal Serotonergic System. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, srep09043. [CrossRef]
99. Zhao, X.; Li, X.L.; Liu, X.; Wang, C.; Zhou, D.S.; Ma, Q.; Zhou, W.H.; Hu, Z.Y. Antinociceptive Effects of Fisetin against Diabetic Neuropathic Pain in Mice: Engagement of Antioxidant Mechanisms and Spinal GABAA Receptors. *Pharmacol. Res.* **2015**, *102*, 286–297. [CrossRef]
100. Sandireddy, R.; Yerra, V.G.; Komirishetti, P.; Areti, A.; Kumar, A. Fisetin Imparts Neuroprotection in Experimental Diabetic Neuropathy by Modulating Nrf2 and NF-κB Pathways. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2016**, *36*, 883–892. [CrossRef]
101. Chattopadhyay, S.; Myers, R.R.; Janes, J.; Shubayev, V. Cytokine Regulation of MMP-9 in Peripheral Glia: Implications for Pathological Processes and Pain in Injured Nerve. *Brain. Behav. Immun.* **2007**, *21*, 561–568. [CrossRef]
102. Kawasaki, Y.; Xu, Z.Z.; Wang, X.; Park, J.Y.; Zhuang, Z.Y.; Tan, P.H.; Gao, Y.J.; Roy, K.; Corfas, G.; Lo, E.H.; et al. Distinct Roles of Matrix Metalloproteases in the Early- and Late-Phase Development of Neuropathic Pain. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 331–336. [CrossRef]
103. Kobayashi, H.; Chattopadhyay, S.; Kato, K.; Dolkas, J.; Kikuchi, S.; Myers, R.R.; Shubayev, V.I. MMPs Initiate Schwann Cell-Mediated MBP Degradation and Mechanical Nociception after Nerve Damage. *Mol. Cell. Neurosci.* **2008**, *39*, 619–627. [CrossRef] [PubMed]
104. Chandler, S.; Coates, R.; Gearing, A.; Lury, J.; Wells, G.; Bone, E. Matrix Metalloproteinases Degrade Myelin Basic Protein. *Neurosci. Lett.* **1995**, *201*, 223–226. [CrossRef] [PubMed]
105. Devor, M. Sodium Channels and Mechanisms of Neuropathic Pain. *J. Pain* **2006**, *7*, S3. [CrossRef] [PubMed]
106. Singh, S.; Khanna, D.; Kalra, S. Minocycline and Doxycycline: More Than Antibiotics. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2021**, *14*, 1046–1065. [CrossRef]
107. Kim, H.S.; Suh, Y.H. Minocycline and Neurodegenerative Diseases. *Behav. Brain Res.* **2009**, *196*, 168–179. [CrossRef]
108. Garrido-Mesa, N.; Zarzuelo, A.; Gálvez, J. Minocycline: Far beyond an Antibiotic. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 337–352. [CrossRef]
109. Garrido-Mesa, N.; Zarzuelo, A.; Gálvez, J. What Is behind the Non-Antibiotic Properties of Minocycline? *Pharmacol. Res.* **2013**, *67*, 18–30. [CrossRef]
110. Yrjänheikki, J.; Tikka, T.; Keinänen, R.; Goldsteins, G.; Chan, P.H.; Koistinaho, J. A Tetracycline Derivative, Minocycline, Reduces Inflammation and Protects against Focal Cerebral Ischemia with a Wide Therapeutic Window. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13496–13500. [CrossRef]
111. Golub, L.M.; Ramamurthy, N.S.; McNamara, T.F.; Greenwald, R.A.; Rifkin, B.R. Tetracyclines Inhibit Connective Tissue Breakdown: New Therapeutic Implications for an Old Family of Drugs. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **1991**, *2*, 297–321. [CrossRef]
112. Festoff, B.W.; Ameenuddin, S.; Arnold, P.M.; Wong, A.; Santacruz, K.S.; Citron, B.A. Minocycline Neuroprotects, Reduces Microgliosis, and Inhibits Caspase Protease Expression Early after Spinal Cord Injury. *J. Neurochem.* **2006**, *97*, 1314–1326. [CrossRef]
113. Choi, Y.; Kim, H.S.; Shin, K.Y.; Kim, E.M.; Kim, M.; Kim, H.S.; Park, C.H.; Jeong, Y.H.; Yoo, J.; Lee, J.P.; et al. Minocycline Attenuates Neuronal Cell Death and Improves Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease Models. *Neuropsychopharmacology* **2007**, *32*, 2393–2404. [CrossRef]
114. Thomas, M.; Le, W. Minocycline: Neuroprotective Mechanisms in Parkinson's Disease. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 679–686. [CrossRef] [PubMed]
115. Thomas, M.; Ashizawa, T.; Jankovic, J. Minocycline in Huntington's Disease: A Pilot Study. *Mov. Disord.* **2004**, *19*, 692–695. [CrossRef] [PubMed]

116. Zhu, S.; Stavrovskaya, I.G.; Drozda, M.; Kim, B.Y.S.; Ona, V.; Li, M.; Sarang, S.; Liu, A.S.; Hartley, D.M.; Wu, D.C.; et al. Minocycline Inhibits Cytochrome c Release and Delays Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Mice. *Nature* **2002**, *417*, 74–78. [CrossRef]
117. Brundula, V.; Rewcastle, N.B.; Metz, L.M.; Bernard, C.C.; Yong, V.W. Targeting Leukocyte MMPs and Transmigration: Minocycline as a Potential Therapy for Multiple Sclerosis. *Brain* **2002**, *125*, 1297–1308. [CrossRef] [PubMed]
118. Wang, B.; Huang, X.; Pan, X.; Zhang, T.; Hou, C.; Su, W.J.; Liu, L.L.; Li, J.M.; Wang, Y.X. Minocycline Prevents the Depressive-like Behavior through Inhibiting the Release of HMGB1 from Microglia and Neurons. *Brain. Behav. Immun.* **2020**, *88*, 132–143. [CrossRef]
119. Pan, Y.D.; Guo, Q.L.; Wang, E.; Ye, Z.; He, Z.H.; Zou, W.Y.; Cheng, Z.G.; Wang, Y.-J. Intrathecal Infusion of Pyrrolidine Dithiocarbamate for the Prevention and Reversal of Neuropathic Pain in Rats Using a Sciatic Chronic Constriction Injury Model. *Reg. Anesth. Pain Med.* **2010**, *35*, 231–237. [CrossRef]
120. Wang, P.; Farmer, J.P.; Rullo, J. Minocycline-Induced Hyperpigmentation. *JAMA Dermatol.* **2021**, *157*, 992. [CrossRef]
121. Budni, J.; Garcez, M.L.; de Medeiros, J.; Cassaro, E.; Bellettini-Santos, T.; Mina, F.; Quevedo, J. The Anti-Inflammatory Role of Minocycline in Alzheimers Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2016**, *13*, 1319–1329. [CrossRef] [PubMed]
122. Yong, V.W.; Wells, J.; Giuliani, F.; Casha, S.; Power, C.; Metz, L.M. The Promise of Minocycline in Neurology. *Lancet Neurol.* **2004**, *3*, 744–751. [CrossRef] [PubMed]
123. Kobayashi, K.; Yamanaka, H.; Fukuoka, T.; Dai, Y.; Obata, K.; Noguchi, K. P2Y12 Receptor Upregulation in Activated Microglia Is a Gateway of p38 Signaling and Neuropathic Pain. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 2892–2902. [CrossRef] [PubMed]
124. Koistinaho, M.; Malm, T.M.; Kettunen, M.I.; Goldsteins, G.; Starckx, S.; Kauppinen, R.A.; Opdenakker, G.; Koistinaho, J. Minocycline Protects against Permanent Cerebral Ischemia in Wild Type but Not in Matrix Metalloprotease-9-Deficient Mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2005**, *25*, 460–467. [CrossRef]
125. Sanchez Mejia, R.O.; Ona, V.O.; Li, M.; Friedlander, R.M. Minocycline Reduces Traumatic Brain Injury-Mediated Caspase-1 Activation, Tissue Damage, and Neurological Dysfunction. *Neurosurgery* **2001**, *48*, 1393–1401. [CrossRef]
126. Saikali, Z.; Singh, G. Doxycycline and Other Tetracyclines in the Treatment of Bone Metastasis. *Anticancer Drugs* **2003**, *14*, 773–778. [CrossRef]
127. Campbell, J.H.; Burdo, T.H.; Autissier, P.; Bombardier, J.P.; Westmoreland, S.V.; Soulas, C.; González, R.G.; Ratai, E.M.; Williams, K.C. Minocycline Inhibition of Monocyte Activation Correlates with Neuronal Protection in SIV NeuroAIDS. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18688. [CrossRef]
128. Osikowicz, M.; Skup, M.; Mika, J.; Makuch, W.; Czarkowska-Bauch, J.; Przewlocka, B. Glial Inhibitors Influence the MRNA and Protein Levels of MGlu2/3, 5 and 7 Receptors and Potentiate the Analgesic Effects of Their Ligands in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Pain* **2009**, *147*, 175–186. [CrossRef]
129. Popiolek-Barczyk, K.; Rojewska, E.; Jurga, A.M.; Makuch, W.; Zador, F.; Borsodi, A.; Piotrowska, A.; Przewlocka, B.; Mika, J. Minocycline Enhances the Effectiveness of Nociceptin/Orphanin FQ during Neuropathic Pain. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 762930. [CrossRef]
130. Mika, J.; Popiolek-Barczyk, K.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Starowicz, K.; Przewlocka, B. Delta-Opioid Receptor Analgesia Is Independent of Microglial Activation in a Rat Model of Neuropathic Pain. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104420. [CrossRef]
131. Shin, D.A.; Kim, T.U.; Chang, M.C. Minocycline for Controlling Neuropathic Pain: A Systematic Narrative Review of Studies in Humans. *J. Pain Res.* **2021**, *14*, 139–145. [CrossRef]
132. Mika, J.; Zychowska, M.; Popiolek-Barczyk, K.; Rojewska, E.; Przewlocka, B. Importance of Glial Activation in Neuropathic Pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *716*, 106–119. [CrossRef] [PubMed]
133. Popiolek-Barczyk, K.; Mika, J. Targeting the Microglial Signaling Pathways: New Insights in the Modulation of Neuropathic Pain. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 2908–2928. [CrossRef] [PubMed]
134. Kwiatkowski, K.; Mika, J. The Importance of Chemokines in Neuropathic Pain Development and Opioid Analgesic Potency. *Pharmacol. Rep.* **2018**, *70*, 821–830. [CrossRef] [PubMed]
135. Rojewska, E.; Piotrowska, A.; Popiolek-Barczyk, K.; Mika, J. Botulinum Toxin Type A—A Modulator of Spinal Neuron–Glia Interactions under Neuropathic Pain Conditions. *Toxins* **2018**, *10*, 145. [CrossRef]
136. Johnston, I.N.; Milligan, E.D.; Wieseler-Frank, J.; Frank, M.G.; Zapata, V.; Campisi, J.; Langer, S.; Martin, D.; Green, P.; Fleshner, M.; et al. A Role for Proinflammatory Cytokines and Fractalkine in Analgesia, Tolerance, and Subsequent Pain Facilitation Induced by Chronic Intrathecal Morphine. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 7353. [CrossRef]
137. Zajączkowska, R.; Pawlik, K.; Ciapała, K.; Piotrowska, A.; Ciechanowska, A.; Rojewska, E.; Kocot-Kępska, M.; Makuch, W.; Wordliczek, J.; Mika, J. Mirogabalin Decreases Pain-like Behaviors by Inhibiting the Microglial/Macrophage Activation, p38MAPK Signaling, and Pronociceptive CCL2 and CCL5 Release in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1023. [CrossRef]
138. Kwiatkowski, K.; Piotrowska, A.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Jurga, A.; Slusarczyk, J.; Trojan, E.; Basta-Kaim, A.; Mika, J. Beneficial Properties of Maraviroc on Neuropathic Pain Development and Opioid Effectiveness in Rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2016**, *64*, 68–78. [CrossRef]
139. Wen, Y.R.; Tan, P.H.; Cheng, J.K.; Liu, Y.C.; Ji, R.R. Microglia: A Promising Target for Treating Neuropathic and Postoperative Pain, and Morphine Tolerance. *J. Formos. Med. Assoc.* **2011**, *110*, 487–494. [CrossRef]

140. Piotrowska, A.; Kwiatkowski, K.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Mika, J. Maraviroc Reduces Neuropathic Pain through Polarization of Microglia and Astroglia—Evidence from in Vivo and in Vitro Studies. *Neuropharmacology* **2016**, *108*, 207–219. [CrossRef]
141. Kwiatkowski, K.; Pawlik, K.; Ciapała, K.; Piotrowska, A.; Makuch, W.; Mika, J. Bidirectional Action of Cenicriviroc, a CCR2/CCR5 Antagonist, Results in Alleviation of Pain-Related Behaviors and Potentiation of Opioid Analgesia in Rats with Peripheral Neuropathy. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 615327. [CrossRef] [PubMed]
142. Pawlik, K.; Piotrowska, A.; Kwiatkowski, K.; Ciapała, K.; Popiolek-Barczyk, K.; Makuch, W.; Mika, J. The Blockade of CC Chemokine Receptor Type 1 Influences the Level of Nociceptive Factors and Enhances Opioid Analgesic Potency in a Rat Model of Neuropathic Pain. *Immunology* **2020**, *159*, 413–428. [CrossRef] [PubMed]
143. Sobot, N.M.; Sobot, T.S.; Jeremic, J.N.; Bolevich, S.B.; Bolevich, S.S.; Mitrovic, S.L.; Fisenko, V.P.; Inic, S.G.; Samanovic, A.D.M.; Rankovic, M.R.; et al. Minocycline as Heart Conditioning Agent in Experimental Type 2 Diabetes Mellitus—An Antibacterial Drug in Heart Protection. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **2022**, *395*, 429–444. [CrossRef]
144. Yuan, H.; Zhang, X.; Zheng, W.; Zhou, H.; Zhang, B.Y.; Zhao, D. Minocycline Attenuates Kidney Injury in a Rat Model of Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy. *Biol. Pharm. Bull.* **2016**, *39*, 1231–1237. [CrossRef] [PubMed]
145. Shaughnessy, K.K.; Bouchard, S.M.; Mohr, M.R.; Herre, J.M.; Salkey, K.S. Minocycline-Induced Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) Syndrome with Persistent Myocarditis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2010**, *62*, 315–318. [CrossRef] [PubMed]
146. Teitelbaum, J.E.; Perez-Atayde, A.R.; Cohen, M.; Bousvaros, A.; Jonas, M.M. Minocycline-Related Autoimmune Hepatitis: Case Series and Literature Review. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **1998**, *152*, 1132–1136. [CrossRef] [PubMed]
147. Bellezza, I.; Giambanco, I.; Minelli, A.; Donato, R. Nrf2-Keap1 Signaling in Oxidative and Reductive Stress. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2018**, *1865*, 721–733. [CrossRef]
148. He, F.; Ru, X.; Wen, T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4777. [CrossRef]
149. Robledinos-Antón, N.; Fernández-Ginés, R.; Manda, G.; Cuadrado, A. Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 9372182. [CrossRef]
150. Brandes, M.S.; Gray, N.E. NRF2 as a Therapeutic Target in Neurodegenerative Diseases. *ASN Neuro* **2020**, *12*. [CrossRef]
151. Sun, J.; Li, J.Y.; Zhang, L.Q.; Li, D.Y.; Wu, J.Y.; Gao, S.J.; Liu, D.Q.; Zhou, Y.Q.; Mei, W. Nrf2 Activation Attenuates Chronic Constriction Injury-Induced Neuropathic Pain via Induction of PGC-1 α -Mediated Mitochondrial Biogenesis in the Spinal Cord. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, *2021*, 9577874. [CrossRef] [PubMed]
152. Basu, P.; Averitt, D.L.; Maier, C.; Basu, A. The Effects of Nuclear Factor Erythroid 2 (NFE2)-Related Factor 2 (Nrf2) Activation in Preclinical Models of Peripheral Neuropathic Pain. *Antioxidants* **2022**, *11*, 430. [CrossRef] [PubMed]
153. Wang, L.; He, C. Nrf2-Mediated Anti-Inflammatory Polarization of Macrophages as Therapeutic Targets for Osteoarthritis. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 967193. [CrossRef] [PubMed]
154. Saha, S.; Buttari, B.; Panieri, E.; Profumo, E.; Saso, L. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules* **2020**, *25*, 5474. [CrossRef]
155. Wang, C.; Wang, C. Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Actions of Sulforaphane in Chronic Constriction Injury-Induced Neuropathic Pain Mice. *Inflammopharmacology* **2017**, *25*, 99–106. [CrossRef]
156. Klomparens, E.; Ding, Y. The Neuroprotective Mechanisms and Effects of Sulforaphane. *Brain Circ.* **2019**, *5*, 74. [CrossRef]
157. Ferreira-Chamorro, P.; Redondo, A.; Riego, G.; Leánez, S.; Pol, O. Sulforaphane Inhibited the Nociceptive Responses, Anxiety- and Depressive-Like Behaviors Associated with Neuropathic Pain and Improved the Anti-Allodynic Effects of Morphine in Mice. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1332. [CrossRef]
158. Li, S.; Yang, C.; Fang, X.; Zhan, G.; Huang, N.; Gao, J.; Xu, H.; Hashimoto, K.; Luo, A. Role of Keap1-Nrf2 Signaling in Anhedonia Symptoms in a Rat Model of Chronic Neuropathic Pain: Improvement with Sulforaphane. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 887. [CrossRef]
159. Li, J.; Ma, J.; Lacagnina, M.J.; Lorca, S.; Odem, M.A.; Walters, E.T.; Kavelaars, A.; Grace, P.M. Oral Dimethyl Fumarate Reduces Peripheral Neuropathic Pain in Rodents via NFE2L2 Antioxidant Signaling. *Anesthesiology* **2020**, *132*, 343–356. [CrossRef]
160. Garcia-Mesa, Y.; Xu, H.N.; Vance, P.; Gruenewald, A.L.; Garza, R.; Midkiff, C.; Alvarez-Hernandez, X.; Irwin, D.J.; Gill, A.J.; Kolson, D.L. Dimethyl Fumarate, an Approved Multiple Sclerosis Treatment, Reduces Brain Oxidative Stress in SIV-Infected Rhesus Macaques: Potential Therapeutic Repurposing for HIV Neuroprotection. *Antioxidants* **2021**, *10*, 416. [CrossRef]
161. Dodson, M.; De La Vega, M.R.; Cholanians, A.B.; Schmidlin, C.J.; Chapman, E.; Zhang, D.D. Modulating NRF2 in Disease: Timing Is Everything. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2019**, *59*, 555–575. [CrossRef]
162. Singh, J.; Thapliyal, S.; Kumar, A.; Paul, P.; Kumar, N.; Bisht, M.; Naithani, M.; Rao, S.; Handu, S.S. Dimethyl Fumarate Ameliorates Paclitaxel-Induced Neuropathic Pain in Rats. *Cureus* **2022**, *14*, e28818. [CrossRef] [PubMed]
163. Kalvala, A.K.; Kumar, R.; Sherkhane, B.; Gundu, C.; Arruri, V.K.; Kumar, A. Bardoxolone Methyl Ameliorates Hyperglycemia Induced Mitochondrial Dysfunction by Activating the Keap1-Nrf2-ARE Pathway in Experimental Diabetic Neuropathy. *Mol. Neurobiol.* **2020**, *57*, 3616–3631. [CrossRef] [PubMed]
164. Chang, M.X.; Xiong, F. Astaxanthin and Its Effects in Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases: Recent Advances and Future Directions. *Molecules* **2020**, *25*, 5342. [CrossRef]
165. Nishida, Y.; Nawaz, A.; Hecht, K.; Tobe, K. Astaxanthin as a Novel Mitochondrial Regulator: A New Aspect of Carotenoids, beyond Antioxidants. *Nutrients* **2022**, *14*, 107. [CrossRef] [PubMed]

166. Kohandel, Z.; Farkhondeh, T.; Aschner, M.; Pourbagher-Shahri, A.M.; Samarghandian, S. Anti-Inflammatory Action of Astaxanthin and Its Use in the Treatment of Various Diseases. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *145*, 112179. [CrossRef] [PubMed]
167. Jiang, X.; Yan, Q.; Liu, F.; Jing, C.; Ding, L.; Zhang, L.; Pang, C. Chronic Trans-Astaxanthin Treatment Exerts Antihyperalgesic Effect and Corrects Co-Morbid Depressive like Behaviors in Mice with Chronic Pain. *Neurosci. Lett.* **2018**, *662*, 36–43. [CrossRef]
168. Fakhri, S.; Dargahi, L.; Abbaszadeh, F.; Jorjani, M. Effects of Astaxanthin on Sensory-Motor Function in a Compression Model of Spinal Cord Injury: Involvement of ERK and AKT Signalling Pathway. *Eur. J. Pain* **2019**, *23*, 750–764. [CrossRef]
169. Kohandel, Z.; Farkhondeh, T.; Aschner, M.; Samarghandian, S. Nrf2 a Molecular Therapeutic Target for Astaxanthin. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *137*, 111374. [CrossRef]
170. Ashrafizadeh, M.; Ahmadi, Z.; Yaribeygi, H.; Sathyapalan, T.; Sahebkar, A. Astaxanthin and Nrf2 Signaling Pathway: A Novel Target for New Therapeutic Approaches. *Mini Rev. Med. Chem.* **2021**, *22*, 312–321. [CrossRef]
171. Zhao, L.; Tao, X.; Wan, C.; Dong, D.; Wang, C.; Xi, Q.; Liu, Y.; Song, T. Astaxanthin Alleviates Inflammatory Pain by Regulating the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor-Erythroid Factor 2-Related Factor/Heme Oxygenase-1 Pathways in Mice. *Food Funct.* **2021**, *12*, 12381–12394. [CrossRef] [PubMed]
172. Mohammadi, S.; Fakhri, S.; Mohammadi-Farani, A.; Farzaei, M.H.; Abbaszadeh, F. Astaxanthin Engages the l -Arginine/NO/CGMP/KATPchannel Signaling Pathway toward Antinociceptive Effects. *Behav. Pharmacol.* **2021**, *32*, 607–614. [CrossRef] [PubMed]
173. Hill, W.S.; Dohnalek, M.H.; Ha, Y.; Kim, S.J.; Jung, J.C.; Kang, S.B. A Multicenter, Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of a Krill Oil, Astaxanthin, and Oral Hyaluronic Acid Complex on Joint Health in People with Mild Osteoarthritis. *Nutrients* **2023**, *15*, 3769. [CrossRef]
174. Urakaze, M.; Kobashi, C.; Satou, Y.; Shigeta, K.; Toshima, M.; Takagi, M.; Takahashi, J.; Nishida, H. The Beneficial Effects of Astaxanthin on Glucose Metabolism and Modified Low-Density Lipoprotein in Healthy Volunteers and Subjects with Prediabetes. *Nutrients* **2021**, *13*, 4381. [CrossRef] [PubMed]
175. Gowd, V.; Xiao, J.; Wang, M.; Chen, F.; Cheng, K.W. Multi-Mechanistic Antidiabetic Potential of Astaxanthin: An Update on Preclinical and Clinical Evidence. *Mol. Nutr. Food Res.* **2021**, *65*, 2100252. [CrossRef] [PubMed]
176. Faraone, I.; Sinisgalli, C.; Ostuni, A.; Armentano, M.F.; Carmosino, M.; Milella, L.; Russo, D.; Labanca, F.; Khan, H. Astaxanthin Anticancer Effects Are Mediated through Multiple Molecular Mechanisms: A Systematic Review. *Pharmacol. Res.* **2020**, *155*, 104689. [CrossRef] [PubMed]
177. Kim, J.H.; Park, J.J.; Lee, B.J.; Joo, M.K.; Chun, H.J.; Lee, S.W.; Bak, Y.T. Astaxanthin Inhibits Proliferation of Human Gastric Cancer Cell Lines by Interrupting Cell Cycle Progression. *Gut Liver* **2016**, *10*, 369–374. [CrossRef]
178. Wu, H.; Niu, H.; Shao, A.; Wu, C.; Dixon, B.J.; Zhang, J.; Yang, S.; Wang, Y. Astaxanthin as a Potential Neuroprotective Agent for Neurological Diseases. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 5750–5766. [CrossRef]
179. Zaafan, M.A.; Abdelhamid, A.M. The Cardioprotective Effect of Astaxanthin against Isoprenaline-Induced Myocardial Injury in Rats: Involvement of TLR4/NF-κB Signaling Pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2021**, *25*, 4099–4105. [CrossRef]
180. Kaltschmidt, B.; Kaltschmidt, C. NF-KappaB in the Nervous System. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**, *1*, a001271. [CrossRef]
181. Shih, R.-H.; Wang, C.-Y.; Yang, C.-M. NF-KappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Front. Mol. Neurosci.* **2015**, *8*, 77. [CrossRef] [PubMed]
182. Meunier, A.; Latrémolière, A.; Dominguez, E.; Mauborgne, A.; Philippe, S.; Hamon, M.; Mallet, J.; Benoliel, J.; Pohl, M. Lentiviral-Mediated Targeted NF-κB Blockade in Dorsal Spinal Cord Glia Attenuates Sciatic Nerve Injury—Induced Neuropathic Pain in the Rat. *Mol. Ther.* **2007**, *15*, 687–697. [CrossRef]
183. Tchivileva, I.E.; Nackley, A.G.; Qian, L.; Wentworth, S.; Conrad, M.; Diatchenko, L.B. Characterization of NF-κB -Mediated Inhibition of Catechol-O-Methyltransferase. *Mol. Pain* **2009**, *5*, 13. [CrossRef] [PubMed]
184. Ma, W.; Bisby, M. A Increased Activation of Nuclear Factor Kappa B in Rat Lumbar Dorsal Root Ganglion Neurons Following Partial Sciatic Nerve Injuries. *Brain Res.* **1998**, *797*, 243–254. [CrossRef] [PubMed]
185. GYa, B.; Yakovleva, T.; Terenius, L. NF-Kappa B-like Factors in the Murine Brain. Developmentally-Regulated and Tissue-Specific Expression. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **1993**, *20*, 137–146.
186. Kaltschmidt, C.; Kaltschmidt, B.; Baeuerle, P.A. Brain Synapses Contain Inducible Forms of the Transcription Factor NF-Kappa, B. *Mech. Dev.* **1993**, *43*, 135–147. [CrossRef]
187. Albensi, B.C. What Is Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) Doing in and to the Mitochondrion? *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 154. [CrossRef]
188. Oeckinghaus, A.; Ghosh, S. The NF-κB Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**, *1*, a000034. [CrossRef]
189. Lee, K.M.; Kang, B.S.; Lee, H.L.; Son, S.J.; Hwang, S.H.; Kim, D.S.; Park, J.S.; Cho, H.J. Spinal NF-κB Activation Induces COX-2 Upregulation and Contributes to Inflammatory Pain Hypersensitivity. *Eur. J. Neurosci.* **2004**, *19*, 3375–3381. [CrossRef]
190. Lee, M.K.; Han, S.R.; Park, M.K.; Kim, M.J.; Bae, Y.C.; Kim, S.K.; Park, J.S.; Ahn, D.K. Behavioral Evidence for the Differential Regulation of p-p38 MAPK and p-NF-κB in Rats with Trigeminal Neuropathic Pain. *Mol. Pain* **2011**, *7*, 57. [CrossRef]
191. Zhou, C.; Shi, X.; Huang, H.; Zhu, Y.; Wu, Y. Montelukast Attenuates Neuropathic Pain through Inhibiting p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor-Kappa B in a Rat Model of Chronic Constriction Injury. *Anesth. Analg.* **2014**, *118*, 1090–1096. [CrossRef] [PubMed]

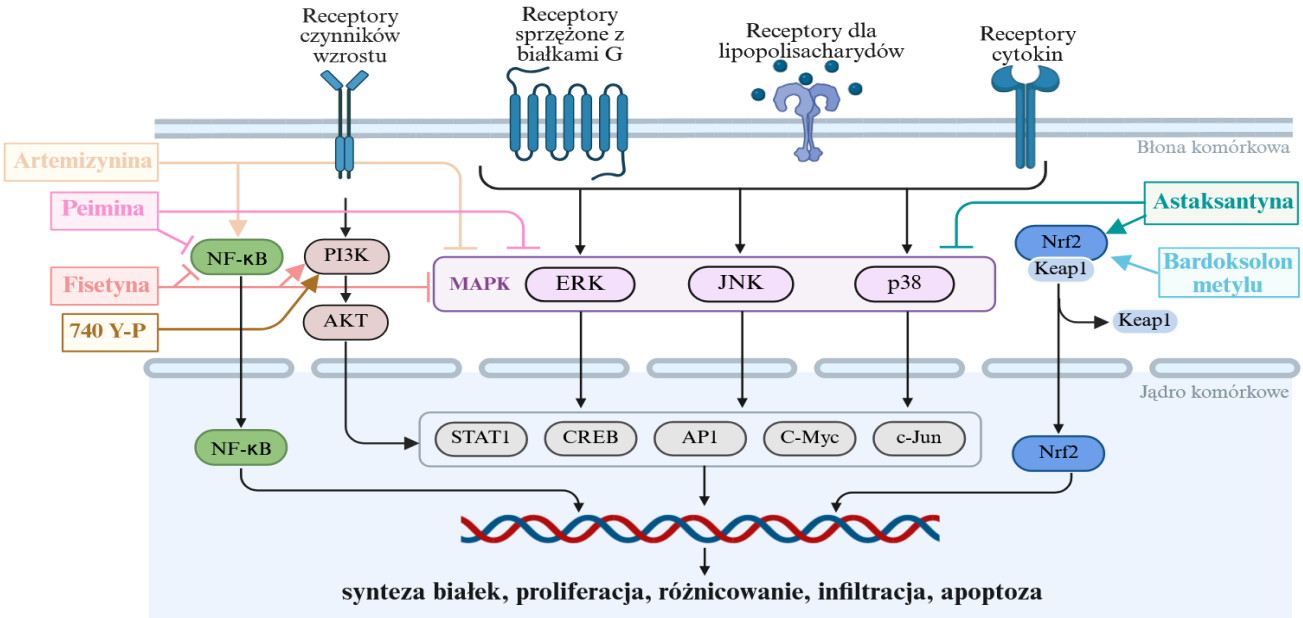
192. Li, Z.; Bai, H.; Zhang, R.; Chen, B.; Wang, J.; Xue, B.; Ren, X.; Wang, J.; Jia, Y.; Zang, W.; et al. Systematic Analysis of Critical Genes and Pathways Identified a Signature of Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. *Eur. J. Neurosci.* **2022**, *56*, 3991–4008. [CrossRef]
193. Kan, L.; Zhao, W.; Pan, L.; Xu, J.; Chen, Q.; Xu, K.; Xiao, L.; Chen, Y. Peimine Inhibits HERG Potassium Channels through the Channel Inactivation States. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *89*, 838–844. [CrossRef] [PubMed]
194. Yin, Z.; Zhang, J.; Guo, Q.; Chen, L.; Zhang, W.; Kang, W. Pharmacological Effects of Verticine: Current Status. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2019**, *2019*, 2394605. [CrossRef] [PubMed]
195. Park, J.H.; Lee, B.; Kim, H.K.; Kim, E.Y.; Kim, J.H.; Min, J.H.; Kim, S.; Sohn, Y.; Jung, H.S. Peimine Inhibits the Production of Proinflammatory Cytokines through Regulation of the Phosphorylation of NF-κB and MAPKs in HMC-1 Cells. *Pharmacogn. Mag.* **2017**, *13*, S359–S364. [CrossRef] [PubMed]
196. Sun, J.; Li, J.; Kong, X.; Guo, Q. Peimine Inhibits MCF-7 Breast Cancer Cell Growth by Modulating Inflammasome Activation: Critical Roles of MAPK and NF-κB Signaling. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2023**, *23*, 317–327. [CrossRef]
197. Qian, B.C.; Xu, H.J. Studies on the Antitussive and Sedative Activities of Peimine and Peiminine. *Acta Pharm. Sin.* **1985**, *20*, 306–308.
198. Alberola-Die, A.; Encinar, J.A.; Cobo, R.; Fernández-Ballester, G.; González-Ros, J.M.; Ivorra, I.; Morales, A. Peimine, an Anti-Inflammatory Compound from Chinese Herbal Extracts, Modulates Muscle-Type Nicotinic Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11287. [CrossRef]
199. Cai, Z.H.; Tian, Y.G.; Li, J.Z.; Zhao, P.; Li, J.S.; Mei, X.; Bai, Y.P. Peimine Ameliorates Pulmonary Fibrosis via the Inhibition of M2-Type Macrophage Polarization through the Suppression of p38/Akt/STAT6 Signals. *Biosci. Rep.* **2022**, *42*, BSR20220986. [CrossRef]
200. Samakova, A.; Gazova, A.; Sabova, N.; Valaskova, S.; Jurikova, M.; Kyselovic, J. The Pi3k/Akt Pathway Is Associated with Angiogenesis, Oxidative Stress and Survival of Mesenchymal Stem Cells in Pathophysiologic Condition in Ischemia. *Physiol. Res.* **2019**, *68*, S131–S138. [CrossRef]
201. Davis, W.J.; Lehmann, P.Z.; Li, W. Nuclear PI3K Signaling in Cell Growth and Tumorigenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* **2015**, 3. [CrossRef] [PubMed]
202. Hemmings, B.A.; Restuccia, D.F. PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a011189. [CrossRef] [PubMed]
203. Kelly, Á.; Lynch, M. Long-Term Potentiation in Dentate Gyrus of the Rat Is Inhibited by the Phosphoinositide 3–Kinase Inhibitor, Wortmannin. *Neuropharmacology* **2000**, *39*, 643–651. [CrossRef] [PubMed]
204. Lin, X.; Bohle, A.S.; Dohrmann, P.; Leuschner, I.; Schulz, A.; Kremer, B.; Fandrich, F. Overexpression of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Human Lung Cancer. *Langenbecks Arch. Surg.* **2001**, *386*, 293–301. [CrossRef] [PubMed]
205. Man, H.Y.; Wang, Q.; Lu, W.Y.; Ju, W.; Ahmadian, G.; Liu, L.; D'Souza, S.; Wong, T.P.; Taghibiglou, C.; Lu, J.; et al. Activation of PI3-Kinase Is Required for AMPA Receptor Insertion during LTP of MEPSCs in Cultured Hippocampal Neurons. *Neuron* **2003**, *38*, 611–624. [CrossRef] [PubMed]
206. Sun, R.; Yan, J.; Willis, W.D. Activation of Protein Kinase B/Akt in the Periphery Contributes to Pain Behavior Induced by Capsaicin in Rats. *Neuroscience* **2007**, *144*, 286–294. [CrossRef]
207. Xu, J.-T.; Tu, H.-Y.; Xin, W.-J.; Liu, X.-G.; Zhang, G.-H.; Zhai, C.-H. Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Protein Kinase B/Akt in Dorsal Root Ganglia and Spinal Cord Contributes to the Neuropathic Pain Induced by Spinal Nerve Ligation in Rats. *Exp. Neurol.* **2007**, *206*, 269–279. [CrossRef]
208. Carvalho, T.T.; Flauzino, T.; Otaguiri, E.S.; Batistela, A.P.; Zarpelon, A.C.; Cunha, T.M.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q.; Verri, W.A. Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) Induces Mechanical Hyperalgesia via Spinal Activation of MAP Kinases and PI3K in Mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2011**, *98*, 188–195. [CrossRef]
209. Pezet, S.; Marchand, F.; D'Mello, R.; Grist, J.; Clark, A.K.; Malcangio, M.; Dickenson, A.H.; Williams, R.J.; McMahon, S.B. Phosphatidylinositol 3-Kinase Is a Key Mediator of Central Sensitization in Painful Inflammatory Conditions. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 4261–4270. [CrossRef]
210. Yu, L.-N.; Zhou, X.-L.; Yu, J.; Huang, H.; Jiang, L.-S.; Zhang, F.-J.; Cao, J.-L.; Yan, M. PI3K Contributed to Modulation of Spinal Nociceptive Information Related to EphrinBs/EphBs. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40930. [CrossRef]
211. Chen, S.-P.; Zhou, Y.-Q.; Liu, D.-Q.; Zhang, W.; Manyande, A.; Guan, X.-H.; Tian, Y.; Ye, D.-W.; Omar, D.M. PI3K/Akt Pathway: A Potential Therapeutic Target for Chronic Pain. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 1860–1868. [CrossRef] [PubMed]
212. Jiang, Z.; Wu, S.; Wu, X.; Zhong, J.; Lv, A.; Jiao, J.; Chen, Z. Blocking Mammalian Target of Rapamycin Alleviates Bone Cancer Pain and Morphine Tolerance via M-Opioid Receptor. *Int. J. Cancer* **2015**, *138*, 2013–2020. [CrossRef] [PubMed]
213. Jiang, S.P.; Zhang, Z.D.; Kang, L.M.; Wang, Q.H.; Zhang, L.; Chen, H.P. Celecoxib Reverts Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain through Inhibiting PI3K/Akt2 Pathway in the Mouse Dorsal Root Ganglion. *Exp Neurol.* **2016**, *275*, 11–16. [CrossRef] [PubMed]
214. Liu, K.; Yang, Y.; Zhou, F.; Xiao, Y.; Shi, L. Inhibition of PI3K/AKT/MTOR Signaling Pathway Promotes Autophagy and Relieves Hyperalgesia in Diabetic Rats. *Neuroreport* **2020**, *31*, 644–649. [CrossRef]
215. Saponaro, C.; Cianciulli, A.; Calvello, R.; Dragone, T.; Iacobazzi, F.; Panaro, M.A. The PI3K/Akt Pathway Is Required for LPS Activation of Microglial Cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2012**, *34*, 858–865. [CrossRef]
216. Park, H.Y.; Kim, N.D.; Kim, G.-Y.; Hwang, H.J.; Kim, B.-W.; Kim, W.J.; Choi, Y.H. Inhibitory Effects of Diallyl Disulfide on the Production of Inflammatory Mediators and Cytokines in Lipopolysaccharide-Activated BV2 Microglia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *262*, 177–184. [CrossRef]

217. Horvath, R.J.; DeLeo, J.A. Morphine Enhances Microglial Migration through Modulation of P2X4 Receptor Signaling. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 998–1005. [CrossRef]
218. Sutherland, T.C.; Geoffroy, C.G. The Influence of Neuron-Extrinsic Factors and Aging on Injury Progression and Axonal Repair in the Central Nervous System. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 190. [CrossRef]
219. Ravula, A.R.; Teegala, S.B.; Kalakotla, S.; Pasangulapati, J.P.; Perumal, V.; Boyina, H.K. Fisetin, Potential Flavonoid with Multifarious Targets for Treating Neurological Disorders: An Updated Review. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, *910*, 174492. [CrossRef]
220. Fazel Nabavi, S.; Braidy, N.; Habtemariam, S.; Sureda, A.; Manayi, A.; Mohammad Nabavi, S. Neuroprotective Effects of Fisetin in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: From Chemistry to Medicine. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 1910–1915. [CrossRef]
221. Hemanth Kumar, B.; Arun Reddy, R.; Mahesh Kumar, J.; Dinesh Kumar, B.; Diwan, P.V. Effects of Fisetin on Hyperhomocysteinemia-Induced Experimental Endothelial Dysfunction and Vascular Dementia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2017**, *95*, 32–42. [CrossRef] [PubMed]
222. Chen, T.J.; Feng, Y.; Liu, T.; Wu, T.T.; Chen, Y.J.; Li, X.; Li, Q.; Wu, Y.C. Fisetin Regulates Gut Microbiota and Exerts Neuroprotective Effect on Mouse Model of Parkinson's Disease. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 549037. [CrossRef] [PubMed]
223. Maher, P.; Dargusch, R.; Bodai, L.; Gerard, P.E.; Purcell, J.M.; Lawrence Marsh, J. ERK Activation by the Polyphenols Fisetin and Resveratrol Provides Neuroprotection in Multiple Models of Huntington's Disease. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 261–270. [CrossRef] [PubMed]
224. Wang, L.; Cao, D.; Wu, H.; Jia, H.; Yang, C.; Zhang, L. Fisetin Prolongs Therapy Window of Brain Ischemic Stroke Using Tissue Plasminogen Activator: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **2019**, *25*. [CrossRef]
225. Yousefzadeh, M.J.; Zhu, Y.; McGowan, S.J.; Angelini, L.; Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Xu, M.; Ling, Y.Y.; Melos, K.I.; Pirtskhalava, T.; Inman, C.L.; et al. Fisetin Is a Senotherapeutic That Extends Health and Lifespan. *EBioMedicine* **2018**, *36*, 18–28. [CrossRef]
226. Zhan, J.Q.; Chen, C.N.; Wu, S.X.; Wu, H.J.; Zou, K.; Xiong, J.W.; Wei, B.; Yang, Y.J. Flavonoid Fisetin Reverses Impaired Hippocampal Synaptic Plasticity and Cognitive Function by Regulating the Function of AMPARs in a Male Rat Model of Schizophrenia. *J. Neurochem.* **2021**, *158*, 413–428. [CrossRef]
227. Cheong, H.; Ryu, S.Y.; Oak, M.H.; Cheon, S.H.; Yoo, G.S.; Kim, K.M. Studies of Structure Activity Relationship of Flavonoids for the Anti-Allergic Actions. *Arch. Pharm. Res.* **1998**, *21*, 478–480. [CrossRef]
228. Ravichandran, N.; Suresh, G.; Ramesh, B.; Vijaiyan Siva, G. Fisetin, a Novel Flavonol Attenuates Benzo(a)Pyrene-Induced Lung Carcinogenesis in Swiss Albino Mice. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 1141–1147. [CrossRef]
229. Patel, M.Y.; Panchal, H.V.; Ghribi, O.; Benzeroual, K.E. The Neuroprotective Effect of Fisetin in the MPTP Model of Parkinson's Disease. *J. Parkinsons. Dis.* **2012**, *2*, 287–302. [CrossRef]
230. Yadav, M.; Pradhan, D.; Singh, R.P. Integrated Analysis and Identification of Nine-Gene Signature Associated to Oral Squamous Cell Carcinoma Pathogenesis. *3 Biotech* **2021**, *11*, 215. [CrossRef]
231. Prasath, G.S.; Subramanian, S.P. Antihyperlipidemic Effect of Fisetin, a Bioflavonoid of Strawberries, Studied in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2014**, *28*, 442–449. [CrossRef] [PubMed]
232. Prasath, G.S.; Subramanian, S.P. Modulatory Effects of Fisetin, a Bioflavonoid, on Hyperglycemia by Attenuating the Key Enzymes of Carbohydrate Metabolism in Hepatic and Renal Tissues in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *668*, 492–496. [CrossRef] [PubMed]
233. Zhong, R.; Miao, L.; Zhang, H.; Tan, L.; Zhao, Y.; Tu, Y.; Angel Prieto, M.; Simal-Gandara, J.; Chen, L.; He, C.; et al. Anti-Inflammatory Activity of Flavonols via Inhibiting MAPK and NF-κB Signaling Pathways in RAW264.7 Macrophages. *Curr. Res. Food Sci.* **2022**, *5*, 1176–1184. [CrossRef] [PubMed]
234. Nan, W.; Yao, F.; Li, K.; Lanlan, Z.; Yin, G.; Du, M.; Wu, B. Fisetin Regulates Astrocyte Migration and Proliferation in Vitro. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *39*, 783–790. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4.4. Zbadanie wpływu fisetyny, peiminy, astaksantyny, artemizyny, bardoksolonu metylu i 740 Y-P na nadwrażliwość oraz przeciwbólowe działanie leków opioidowych w mysim modelu bólu neuropatycznego – *praca oryginalna* Ciapała i wsp., *International Journal of Molecular Sciences*, 2023

W ostatnich latach udowodniono, że aktywacja komórek glejowych jest jednym z kluczowych czynników w powstawaniu i utrzymywaniu się bólu neuropatycznego[25,207,208], a proces ten jest ściśle związany ze zmianami w wewnątrzkomórkowych ścieżkach sygnałowych[48,83,209]. Potwierdzono również, że minocyklina wykazuje działanie przeciwbólowe w zwierzęcych modelach bólu neuropatycznego[195,200,210], głównie dzięki zdolności do hamowania aktywacji mikrogleju/makrofagów. Na poziomie molekularnym efekt ten wiąże się z dwoma równoległymi mechanizmami działania minocykliny - hamowaniem p38[196,197] oraz zmniejszeniem aktywności MMP-9[106,198]. W rezultacie dochodzi do spadku produkcji cytokin o działaniu pronocyceptywnym, co przekłada się na redukcję nadwrażliwości bólowej. Dane literaturowe sugerują, że modulacja aktywności wszystkich MAPK przyczynia się do osłabienia objawów bólowych w różnych modelach neuropatii, co wykazano w badaniach przedklinicznych z wykorzystaniem selektywnych inhibitorów p38[102,105,108], ERK1/2[95,98,99] oraz JNK[114]. Istnieją doniesienia, że również czynniki transkrypcyjne takie jak Nrf2[211] i NF-κB[134] oraz PI3K[123] są zaangażowane w procesy nocycepcji. Celem przeprowadzonych eksperymentów stało się zatem określenie i porównanie skuteczności różnych, nieselektywnych inhibitorów kinaz MAP w mysim modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego, a także wpływu tych substancji na działanie przeciwbólowe leków opioidowych. Przeprowadziliśmy podpajęczynówkowe podania peiminy (inhibitora MAPK i NF-κB), fisetyny (inhibitora ERK1/2 i NF-κB, modulatora PI3K), artemizyniny (inhibitora MAPK, aktywatora NF-κB) oraz astaksantyny (inhibitora MAPK, aktywatora Nrf2). Ponadto zbadaliśmy również skuteczność bardoksolonu metylu (selektywnego aktywatora Nrf2) oraz 740 Y-P (selektywnego aktywatora PI3K) po podaniach podpajęczynówkowych w tym samym modelu bólu neuropatycznego (**Rycina 6**).



Rycina 6. *Działanie wybranych modulatorów wybranych wewnętrznych szlaków sygnałowych – schemat własny na podstawie literatury* [212,287,288,294,301,305,306]. ***Legenda:*** *⊤-inhibitor, →-aktywacja.*

Uzyskane wyniki po raz pierwszy wykazały, że spośród badanych substancji fisetyna, peimina i astaksantyna skutecznie zmniejszają nadwrażliwość dotykową i termiczną u myszy w 7 dniu po podwiązaniu nerwu kulszowego, podczas gdy artemizynina nie wykazuje takiego działania w tym modelu neuropatii. Po raz pierwszy wykazaliśmy również, że selektywna aktywacja zarówno Nrf2 z wykorzystaniem bardoksolonu metylu jak i PI3K przy użyciu 740 Y-P powoduje spadek nadwrażliwości bólowej. W podpajęczynówkowych podaniach łączonych z lekami opioidowymi dowiedliśmy, że peimina w połączeniu z morfiną lub oksykodonem silniej hamuje nadwrażliwość na bodziec dotykowy, natomiast w skojarzeniu z morfiną i buprenorfiną – na bodziec termiczny. Fisetyna w podaniu łączonym z morfiną lub oksykodonem również zwiększa ich skuteczność analgetyczną, natomiast nie wykazuje tego efektu w podaniu z buprenorfiną. Co szczególnie istotne, zarówno podanie astaksantyny jak i bardoksolonu metylu wzmacnia efekt przeciwbólowy wszystkich testowanych leków opioidowych, podczas gdy aktywacja PI3K poprawia ich efektywność jedynie w zakresie nadwrażliwości termicznej (**Rycina 7**). Dane literaturowe wskazują, że obserwowana w naszych badaniach wysoka skuteczność astaksantyny oraz pozostałych analizowanych substancji po podaniu podpajęczynówkowym może wynikać z ich zdolności do równoczesnej modulacji kilku kluczowych szlaków sygnałowych. Jednoczesne oddziaływanie na te szlaki prawdopodobnie umożliwia skuteczne ograniczanie procesów pronocyceptywnych na poziomie rdzenia kręgowego. Spośród badanych substancji najwyższą skuteczność przeciwbólową po podaniu podpajęczynówkowym wykazywała astaksantyna. W świetle dostępnej literatury wysnuliśmy hipotezę, że za efekty analgetyczne tej substancji oraz jej korzystny wpływ na działanie przeciwbólowe leków opioidowych odpowiada sugerowana we wcześniejszych badaniach zdolność do aktywowania przez astaksantynę czynnika transkrypcyjnego Nrf2, co postanowiliśmy zweryfikować w kolejnych eksperymentach behawioralnych.

	Morfina		Buprenorfina		Oksykodon	
	BD	BT	BD	BT	BD	BT
Peimina	↑	↑	-	↑	↑	-
Fisetyna	↑	↑	-	-	↑	↑
740 Y-P	-	↑	-	↑	-	↑
Astaksantyna	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Bardoksolon metylu	-	↑	↑	↑	↑	↑

***Rycina** 7. Wpływ wybranych modulatorów szlaków wewnątrzkomórkowych na działanie przeciwbólowe leków opioidowych.* ***Legenda:** ↑silniejsza odpowiedź analgetyczna,-brak zmian, BD-bodziec dotykowy, BT-bodziec termiczny*

Reasumując, przeprowadzone badania wskazują, że spośród testowanych substancji to astaksantyna wykazuje szczególnie wysoki potencjał przeciwbólowy, co — wobec jej udokumentowanego profilu bezpieczeństwa i statusu suplementu diety — ma szczególne znaczenie translacyjne. Uzyskane wyniki stały się również podstawą do przeprowadzenia kolejnych badań behawioralnych i molekularnych z zastosowaniem podań obwodowych tej substancji w modelach neuropatii o różnej etiologii, co wydało się nam szczególnie istotne w kontekście jej potencjalnych zastosowań klinicznych.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Analgesic Effects of Fisetin, Peimine, Astaxanthin, Artemisinin, Bardoxolone Methyl and 740 Y-P and Their Influence on Opioid Analgesia in a Mouse Model of Neuropathic Pain

Katarzyna Ciapała, Ewelina Rojewska, Katarzyna Pawlik, Agata Ciechanowska and Joanna Mika *

Department of Pain Pharmacology, Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences, 12 Smetna Str., 31-343 Krakow, Poland; kat.ciapala@gmail.com (K.C.); rojewska@if-pan.krakow.pl (E.R.); pawlik@if-pan.krakow.pl (K.P.); ciechan@if-pan.krakow.pl (A.C.)
* Correspondence: joamika@if-pan.krakow.pl or joasia272@onet.eu; Tel.: +48-12-662-3298; Fax: +48-12-637-4500

Abstract: Treatment of neuropathic pain remains a challenge for modern medicine due to the insufficiently understood molecular mechanisms of its development and maintenance. One of the most important cascades that modulate the nociceptive response is the family of mitogen-activated protein (MAP) kinases and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), as well as nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). The aim of this study was to determine the effect of nonselective modulators of MAP kinases—fisetin (ERK1/2 and NFκB inhibitor, PI3K activator), peimine (MAPK inhibitor), astaxanthin (MAPK inhibitor, Nrf2 activator) and artemisinin (MAPK inhibitor, NFκB activator), as well as bardoxolone methyl (selective activator of Nrf2) and 740 Y-P (selective activator of PI3K)—in mice with peripheral neuropathy and to compare their antinociceptive potency and examine their effect on analgesia induced by opioids. The study was performed using albino Swiss male mice that were exposed to chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI model). Tactile and thermal hypersensitivity was measured using von Frey and cold plate tests, respectively. Single doses of substances were administered intrathecally on day 7 after CCI. Among the tested substances, fisetin, peimine, and astaxanthin effectively diminished tactile and thermal hypersensitivity in mice after CCI, while artemisinin did not exhibit analgesic potency in this model of neuropathic pain. Additionally, both of the activators tested, bardoxolone methyl and 740 Y-P, also showed analgesic effects after intrathecal administration in mice exposed to CCI. In the case of astaxanthin and bardoxolone methyl, an increase in analgesia after combined administration with morphine, buprenorphine, and/or oxycodone was observed. Fisetin and peimine induced a similar effect on tactile hypersensitivity, where analgesia was enhanced after administration of morphine or oxycodone. In the case of 740 Y-P, the effects of combined administration with each opioid were observed only in the case of thermal hypersensitivity. The results of our research clearly indicate that substances that inhibit all three MAPKs provide pain relief and improve opioid effectiveness, especially if they additionally block NF-κB, such as peimine, inhibit NF-κB and activate PI3K, such as fisetin, or activate Nrf2, such as astaxanthin. In light of our research, Nrf2 activation appears to be particularly beneficial. The abovementioned substances bring promising results, and further research on them will broaden our knowledge regarding the mechanisms of neuropathy and perhaps contribute to the development of more effective therapy in the future.

Keywords: analgesia; MAPK inhibitors; fisetin; peimine; astaxanthin; morphine; buprenorphine; oxycodone

check for updates

Citation: Ciapała, K.; Rojewska, E.; Pawlik, K.; Ciechanowska, A.; Mika, J. Analgesic Effects of Fisetin, Peimine, Astaxanthin, Artemisinin, Bardoxolone Methyl and 740 Y-P and Their Influence on Opioid Analgesia in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 9000. https://doi.org/10.3390/ijms24109000

Academic Editors: Roberto Coccurello and Sara Marinelli

Received: 26 April 2023
Revised: 16 May 2023
Accepted: 17 May 2023
Published: 19 May 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Neuropathic pain is a chronic condition with multifactorial, still not fully understood pathogenesis resulting from damage to somatosensory neurons in the peripheral and central nervous systems, and its treatment remains a considerable challenge for modern medicine [1]. According to statistics, this kind of pain affects approximately 7–10% of the

population worldwide, and less than half of patients report actual pain relief [2]. Understanding the molecular mechanisms that underlie neuropathic pain is essential for the design of new therapeutic strategies. Even opioids, which are one of the strongest analgesic drugs, will not provide effective pain reduction for every patient with neuropathy, and their prolonged use is associated with the occurrence of adverse effects [3,4]. Nonetheless, these drugs can efficiently relieve moderate-to-severe chronic pain and are widely used in the clinic. Neuronal and glial cell activation are commonly considered critical in the progression of neuropathic pain [5–7], and these processes are associated with modifications to intracellular signaling pathways [8]. One of the most important cascades that modulates the nociceptive response is the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family [9,10]. This evolutionally conserved group contains p38 mitogen-activated protein (p38) and extracellular-regulated (ERK) and c-Jun N-terminal (JNK) kinases. A multiplicity of extracellular stimuli trigger MAPK phosphorylation, leading to different posttranslational and transcriptional downstream responses [11]. Several studies have shown that all three MAPKs are involved in the modulation of nociceptive information, as well as central sensitization [12–16]. A variety of selective MAPK inhibitors, e.g., SB203580, D-JNKI-1, SP600125 and PD198306, have been described to significantly attenuate tactile and thermal hyperalgesia [15,17,18]. However, more effective substances that could have a wider spectrum of action are still being sought. Another interesting target is phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), which is a lipid kinase widely expressed in the spinal cord, particularly in the dorsal horn, where nociceptive C and Aδ fibers of primary afferents principally terminate [19]. Recently, PI3K and its downstream signaling were shown to regulate hypersensitivity [20]. Moreover, at the spinal cord level, the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) seems to be another important pharmacological target for neuropathic pain relief, since its activation induces the expression of many nociceptive molecules [21–23]. It has already been proven that selective NF-κB inhibitors (such as PDTC or SN50) diminish neuropathic pain [24,25]. Accumulating evidence suggests that among transcription factors, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), which regulates antioxidant defense, might also be important for pharmacological treatment. In 2021, it was shown that Nrf2 and its downstream targets appear to be involved in neuropathic pain [26]. In summary, the available literature suggests that changes in p38, ERK1/2, NF-κB, Nrf2 and PI3K play an important, but not fully understood role in the pathogenesis of neuropathic pain and that they may contribute to the downstream activation of many nociceptive factors; therefore, they became the subject of our research. Moreover, new nonspecific bioactive compounds are currently receiving attention, which is why in our research, we tested mainly substances with a broad spectrum of action and some that are safe for people and already approved as dietary supplements. However, their analgesic properties have not been clearly proven thus far.

Therefore, the aim of this study was to examine the influence of different nonselective MAPK inhibitors, such as fisetin (ERK1/2 and NFκB inhibitor, PI3K activator) [27–30], peimine (MAPK and NFκB inhibitor) [31], astaxanthin (MAPK inhibitor, Nrf2 activator) [32–35] and artemisinin (MAPK inhibitor, NFκB activator) [36–38], on tactile and thermal hypersensitivity on day 7 after chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve (neuropathic pain model) in mice. Due to the lack of published data, for comparison, we also studied the effectiveness of a selective activator of Nrf2 (bardoxolone methyl) [39,40] and a selective activator of PI3K (740 Y-P) [41] in CCI-evoked neuropathy. Third, we determined the ability of these modulators to improve the analgesic properties of morphine, buprenorphine and oxycodone in neuropathic pain, especially since all three MAPK and PI3K signaling pathways have been reported to be involved in opioid effectiveness [42,43].

2. Results

2.1. The effect of a Single i.t. Administration of Artemisinin, Peimine, Fisetin and Astaxanthin on Tactile Hypersensitivity on the 7th Day after CCI

Single i.t. injections of intracellular pathway modulators were administered to CCI-exposed mice on day 7 after surgery (Figure 1A). Artemisinin did not influence tactile hypersensitivity measured with the von Frey test compared to vehicle-treated mice at any point after treatment (Figure 1B). In contrast, peimine, fisetin and astaxanthin dose-dependently diminished tactile hypersensitivity on day 7 after CCI.

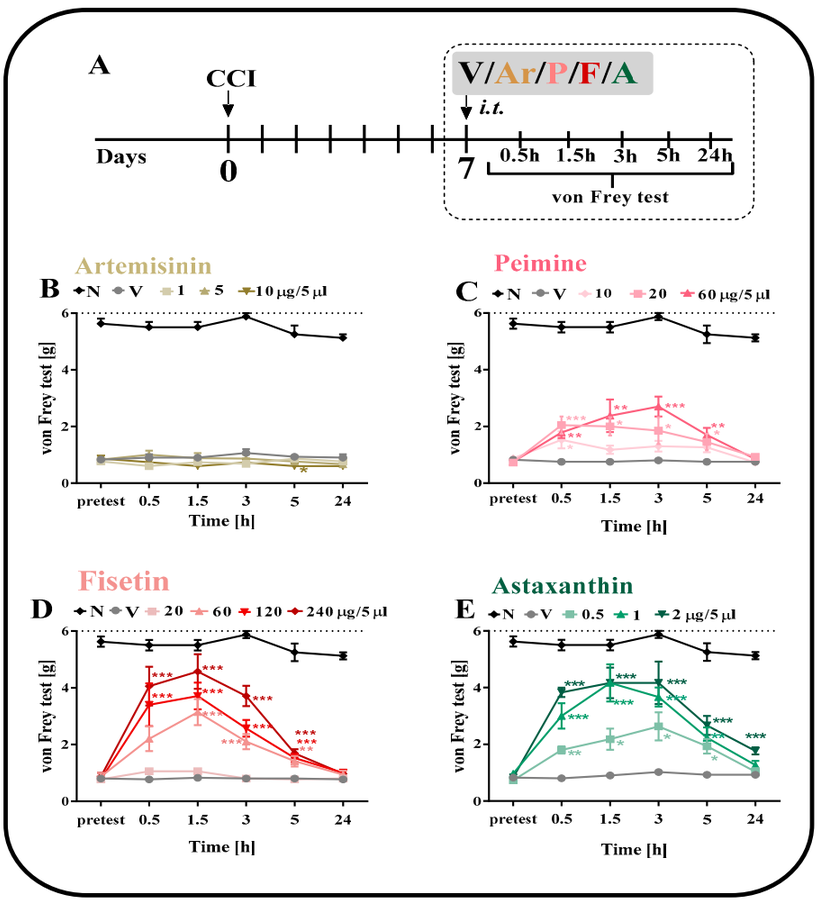


Figure 1. Pharmacological modulation by nonselective, mitogen-activated protein kinase inhibitors influences tactile hypersensitivity (**A**–**E**) in a neuropathic pain model. The effect of single intrathecal administrations of artemisinin (1, 5, 10 µg/5 µL, (**B**), peimine (10, 20, 60 µg/5 µL, (**C**), fisetin (20, 60, 120, 240 µg/5 µL, (**D**) or astaxanthin (0.5, 1, 2 µg/5 µL (**E**) on mechanical stimuli was assessed at 0.5, 1.5, 3, 5 and 24 h after treatment on the 7th day post-CCI using the von Frey test (**A**). The data are presented as means ± SEMs (V n = 8; Ar n = 6; P n = 8; F n = 7; A n = 6—each group). The horizontal dotted line shows the cutoff values. The intergroup differences were analyzed using ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ indicate differences between V-treated CCI-exposed mice and substance-treated CCI-exposed mice. Abbreviations: Ar, artemisinin; P, peimine; F, fisetin; A, astaxanthin; CCI, chronic constriction injury; N, naïve; V, vehicle.

The most effective dose of peimine was 60 µg/5 µL, which had significantly reduced tactile hypersensitivity 3 h after injection ($F_{(3, 28)} = 6653$; $p = 0.0016$), while a dose of 10 µg/5 µL was observed to be effective only 0.5 h after administration (Figure 1C). In the case of fisetin, doses of 60, 120 and 240 µg/5 µL evoked analgesic effects that peaked 1.5 h after administration ($F_{(4, 30)} = 16.62$; $p < 0.0001$), while the lowest dose (20 µg/5 µL) did

not cause analgesia at any studied time point (Figure 1D). Astaxanthin dose-dependently caused a decrease in tactile hypersensitivity for each dose used, and after 24 h, this effect was no longer observed, except for the highest dose (2 µg/5 µL), which was still significantly effective ($F_{(3, 22)}$ = 9490; p = 0.0003) (Figure 1E). Two-way ANOVA confirmed significant interaction between the investigated treatment and the subjected time points for fisetin ($F_{(20, 178)}$ = 6026; $p < 0.0001$), peimine ($F_{(15, 168)}$ = 2556; p = 0.0019) and astaxanthin ($F_{(15, 132)}$ = 5238; $p < 0.0001$).

2.2. The Effect of a Single i.t. Administration of Artemisinin, Peimine, Fisetin and Astaxanthin on Thermal Hypersensitivity on the 7th Day after CCI

Single i.t. injections of intracellular pathway modulators were administered to CCI-exposed mice on day 7 after surgery (Figure 2A).

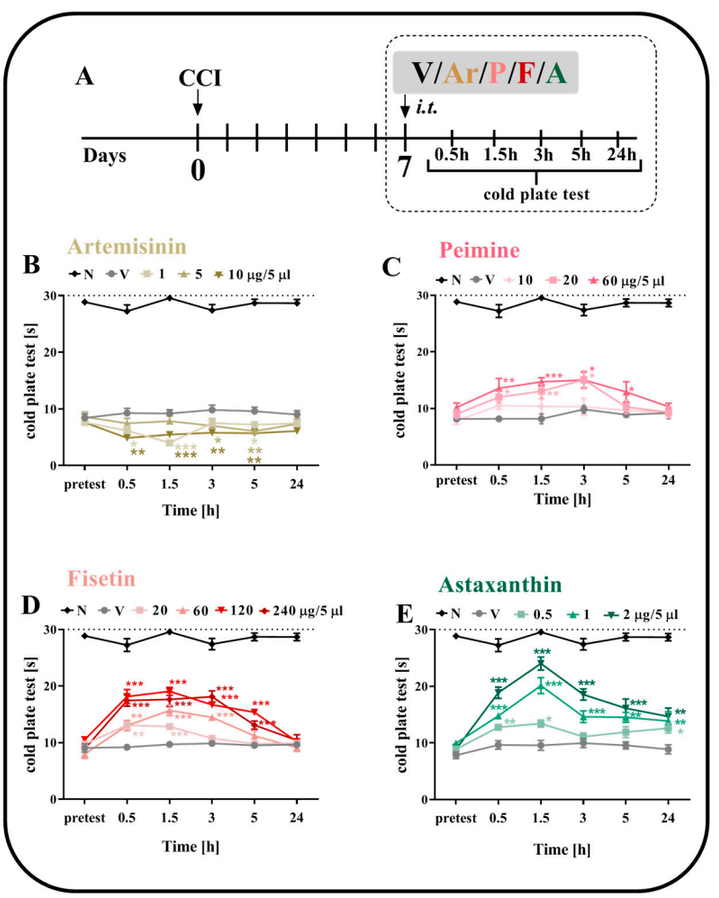


Figure 2. Pharmacological modulation by nonselective, mitogen-activated protein kinase inhibitors influences thermal hypersensitivity (**A**–**E**) in a neuropathic pain model. The effect of single intrathecal administrations of artemisinin (1, 5, 10 µg/5 µL, (**B**), peimine (10, 20, 60 µg/5 µL, (**C**), fisetin (20, 60, 120, 240 µg/5 µL, (**D**) or astaxanthin (0.5, 1, 2 µg/5 µL, (**E**) on thermal hypersensitivity was assessed at 0.5, 1.5, 3, 5 and 24 h after treatment on the 7th day post-CCI with the cold plate test (**A**). The data are presented as means ± SEMs (V n = 8; Ar n = 6; P n = 8; F n = 7; A n = 6—each group). The horizontal dotted line shows the cutoff values. The intergroup differences were analyzed using ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ indicate differences between V-treated CCI-exposed mice and substance-treated CCI-exposed mice. Abbreviations: Ar, artemisinin; P, peimine; F, fisetin; A, astaxanthin; CCI, chronic constriction injury; N, naïve; V, vehicle.

Surprisingly, a single administration of artemisinin enhanced thermal hypersensitivity measured with the cold plate test compared to vehicle-treated mice ($F_{(3, 20)}$ = 5740; p = 0.0053); however, 24 h after administration, this effect was no longer observed (Figure 2B). In contrast, peimine (20, 60 µg/5 µL), fisetin (20, 60, 120, 240 µg/5 µL) and astaxanthin (0.5, 1, 2 µg/5 µL) effectively diminished pain-related behavior. Peimine at the lowest dose (10 µg/5 µL) did not influence thermal hypersensitivity at any tested time point (Figure 2C). Regarding fisetin, each dose evoked an analgesic effect, which lasted up to 5 h after administration in the case of doses of 120 and 240 µg/5 µL ($F_{(4, 28)}$ = 13.62; $p < 0.0001$) (Figure 2D). The most effective reduction of thermal hypersensitivity of astaxanthin was observed for the dose of 2 µg/5 µL 1.5 h after administration ($F_{(3, 22)}$= 40.49; $p < 0.0001$). This substance caused a decrease in thermal hypersensitivity at each dose used, which lasted up to 24 h ($F_{(3, 22)}$ = 5110; p = 0.0078) (Figure 2E). Two-way ANOVA confirmed interaction between the investigated treatment and the subjected time points in case of fisetin ($F_{(20, 173)}$ = 6; $p < 0.0001$) and astaxanthin ($F_{(15, 132)}$ = 4; $p < 0.0001$).

2.3. The Effect of a Single i.t. Administration of Bardoxolone Methyl or 740 Y-P on Pain-Related Behaviors on Day 7 after CCI

A single i.t. injection of bardoxolone methyl diminished tactile hypersensitivity measured using the von Frey test compared to vehicle-treated mice at 0.5, 1.5, 3 and 5 h after treatment (Figure 3A,B). The most effective dose was 20 µg/5 µL, which($F_{(3, 22)}$ = 19.31; $p < 0.0001$) attenuated tactile hypersensitivity 3 h after injection with the greatest potency (Figure 3B).

Regarding the cold plate test, each dose of bardoxolone methyl caused a similarly good analgesic effect 3 h after administration ($F_{(3, 22)}$ = 15,19; $p < 0.0001$) (Figure 3A,C). The doses of 5 and 10 µg/5 µL produced similar attenuation of tactile and thermal hypersensitivity on the von Frey (Figure 3B) and cold plate (Figure 3C) tests. A reduction in tactile hypersensitivity was no longer observed after 24 h, while the decrease in thermal hypersensitivity persisted until 24 h for doses of 10 and 20 µg/5 µL. Two-way ANOVA confirmed significant interaction between the investigated treatment and the subjected time points in von Frey ($F_{(15, 132)}$ = 6856; $p < 0.0001$) and cold plate ($F_{(15, 130)}$ = 6610; $p < 0.0001$) tests.

A single i.t. injection of 740 Y-P (1, 5, 10 and 20 µg/5 µL) diminished tactile (Figure 3A,D) and thermal (Figure 3A,E) hypersensitivity compared to vehicle-treated mice. The dose of 1 µg/5 µL was ineffective in the von Frey test, but in the cold plate test, it exerted a slight analgesic effect, but only 5 h after administration (Figure 3E) ($F_{(4, 24)}$ = 4048; p = 0.0120). Similarly, doses of 10 and 20 µg/5 µL most effectively attenuated CCI-induced tactile (Figure 3D) and thermal (Figure 3E) hypersensitivity. After 24 h, these effects were not observed in any of the tests. Two-way ANOVA confirmed significant interaction between the investigated treatment and the subjected time points in von Frey ($F_{(20, 144)}$ = 3708; $p < 0.0001$) and cold plate ($F_{(20, 144)}$ = 3321; $p < 0.0001$) tests.

2.4. Comparison of the Analgesic Effects of a Single i.t. Administration of Artemisinin, Fisetin, Peimine, Astaxanthin, Bardoxolone Methyl or 740 Y-P on Day 7 after CCI

According to the von Frey test, astaxanthin and 740 Y-P are the substances with the lowest ED_{50} value, while the highest dose of peimine is required to obtain significant pain relief compared to other substances. On the cold plate test, astaxanthin had the lowest ED_{50} value, while peimine had the highest ED_{50} value. It was not possible to determine this value for artemisinin, since this substance after i.t. injection did not exert analgesic effects (Table 1).

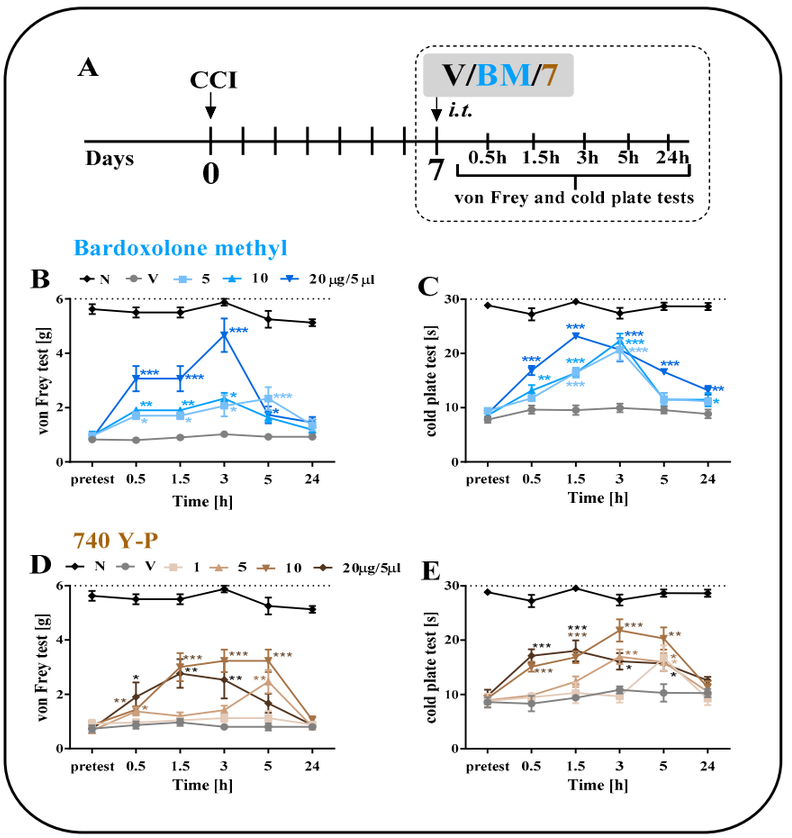


Figure 3. Pharmacological modulation by Nrf2 or Pi3K activators influences tactile and thermal hypersensitivity (**A**–**E**) in a neuropathic pain model. The effect of single intrathecal administrations of bardoxolone methyl (5, 10, 20 µg/5 µL (**B**,**C**)) or 740 Y-P (1, 5, 10, 20 µg/5 µL (**D**,**E**)) on tactile and thermal hypersensitivity was assessed at 0.5, 1.5, 3, 5 and 24 h after treatment on the 7th day post-CCI with von Frey (**B**,**D**) and cold plate (**C**,**E**) tests. The data are presented as means ± SEMs (V n = 8; BM n = 6; 740 Y-P n = 6—each group except the lowest dose of 740 Y-P n = 5). The horizontal dotted line shows the cutoff values. The intergroup differences were analyzed using ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ indicate differences between V-treated CCI-exposed mice and substance-treated CCI-exposed mice. Abbreviations: BM, bardoxolone methyl; 7, 740 Y-P; V, vehicle; CCI, chronic constriction injury; N, naïve; V, vehicle.

Table 1. Calculated ED_{50} values for the effect of each of i.t. administered substances (artemisinin, 1, 5, 10 µg; fisetin, 20, 60, 120 µg; peimine, 10, 20, 60 µg; astaxanthin, 0.5, 1, 2 µg; bardoxolone methyl, 5, 10, 20 µg; 740 Y-P, 1, 5, 10 µg) with 95% confidence intervals in CCI-exposed mice measured by von Frey and cold plate tests 1.5 h after drug injection.

ED_{50}	Von Frey Test	Cold Plate Test
artemisinin	-	-
fisetin	**68.5** (27.3 ± 171.5)	**40.5** (14.7 ± 111.3)
peimine	**214.2** (19.8 ± 2321.5)	**60.5** (14.3 ± 256.6)
astaxanthin	**0.7** (0.2 ± 1.9)	**0.6** (0.4 ± 0.8)
bardoxolone methyl	**22.0** (4.9 ± 98.4)	**4.8** (2.5 ± 9.1)
740 Y-P	**0.7** (20.4 ± 200.6)	**7.5** (2.0 ± 27.9)

Regarding the %MPE calculated for the highest doses of tested substances in von Frey and cold plate tests, fisetin, astaxanthin and bardoxolone methyl were the compounds

that produced the most significant antinociception (Table 2). In contrast, artemisinin was ineffective in both behavioral tests.

Table 2. Calculated %MPE values for the highest dose of each tested substances used in our experiments in CCI-exposed mice in von Frey and cold plate tests, 1.5 h after drug administration. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ indicate differences vs. V-treated CCI-exposed mice.

%MPE	Von Frey Test	Cold Plate Test
vehicle	−0.22 ± 1.99	0.76 ± 4.12
artemisinin (10 µg/5 µL)	3.38 ± 8.32	−10.34 ± 4.83
fisetin (240 µg/5 µL)	71.57 ± 12.07 ***	41.31 ± 5.79 ***
peimine (60 µg/5 µL)	30.91 ± 10.73 *	22.76 ± 2.65 **
astaxanthin (2 µg/5 µL)	64.82 ± 10.14 ***	71.05 ± 6.14 ***
bardoxolone methyl (20 µg/5 µL)	42.96 ± 8.77 **	67.85 ± 2.10 ***
740 Y-P (20 µg/5 µL)	38.64 ± 9.93 **	38.30 ± 13.14 ***

2.5. The Effect of a Single i.t. Administration of Peimine, Fisetin and Astaxanthin on Opioid Effectiveness on the 7th Day after CCI

Since artemisinin did not exert analgesic effects (Figures 1B and 2B), peimine, fisetin and astaxanthin were used (Figure 4A) to test their influence on opioid analgesia, and doses for the following experiments were selected based on a dose-dependence study. Single i.t. injections of morphine (2.5 µg/5 µL), buprenorphine (1 µg/5 µL) or oxycodone (1 µg/5 µL) evoked similar levels of analgesia on von Frey (Figure 4B,D,F) and cold plate (Figure 4C,E,G) tests.

Single i.t. administration of peimine at a dose of 20 µg/5 µL significantly attenuated CCI-induced tactile and thermal hypersensitivity on von Frey ($F_{(7, 40)} = 15.18$; $p < 0.0001$) and cold plate ($F_{(7, 38)} = 11.72$; $p < 0.0001$) tests compared to the vehicle-treated group (Figure 4B,C). The administration of peimine with opioids resulted in more effective attenuation of tactile hypersensitivity in the case of morphine and oxycodone, while thermal hypersensitivity was more effectively reduced in the case of administration with morphine or buprenorphine.

Single i.t. administration of fisetin (60 µg/5 µL) resulted in a decrease in tactile ($F_{(7, 46)} = 9284$; $p < 0.0001$) and thermal ($F_{(7, 45)} = 16.31$; $p < 0.0001$) hypersensitivity (Figure 4D,E). The administration of fisetin with opioids resulted in more effective attenuation of tactile and thermal hypersensitivity in the case of morphine and oxycodone, while it did not influence buprenorphine analgesia (Figure 4D,E).

Astaxanthin administered i.t. (1 µg/5 µL) exerted an analgesic effect, and importantly, injection of this substance with morphine, buprenorphine or oxycodone resulted in a greater decrease in tactile ($F_{(7, 40)} = 16.58$; $p < 0.0001$) (Figure 4F) and thermal ($F_{(7, 39)} = 29.54$; $p < 0.0001$) (Figure 4G) hypersensitivity compared to each of these substances administered alone.

2.6. The Effect of a Single i.t. Administration of Bardoxolone Methyl or 740 Y-P on Opioid Effectiveness on the 7th Day after CCI

The single i.t. administration of bardoxolone methyl (10 µg/5 µL) significantly attenuated CCI-induced tactile and thermal hypersensitivity on von Frey and cold plate tests compared to the vehicle-treated group (Figure 5A–C). Similarly, single i.t. administration of 740 Y-P (10 µg/5 µL) evoked a decrease in hypersensitivity to tactile (Figure 5A,D) and thermal stimuli (Figure 5A,E). Additionally, single i.t. injection of morphine(2.5 µg/5 µL), buprenorphine (1 µg/5 µL) or oxycodone (1 µg/5 µL) caused analgesic effects on the von Frey (Figure 5B,D) and cold plate (Figure 5C,E) tests.

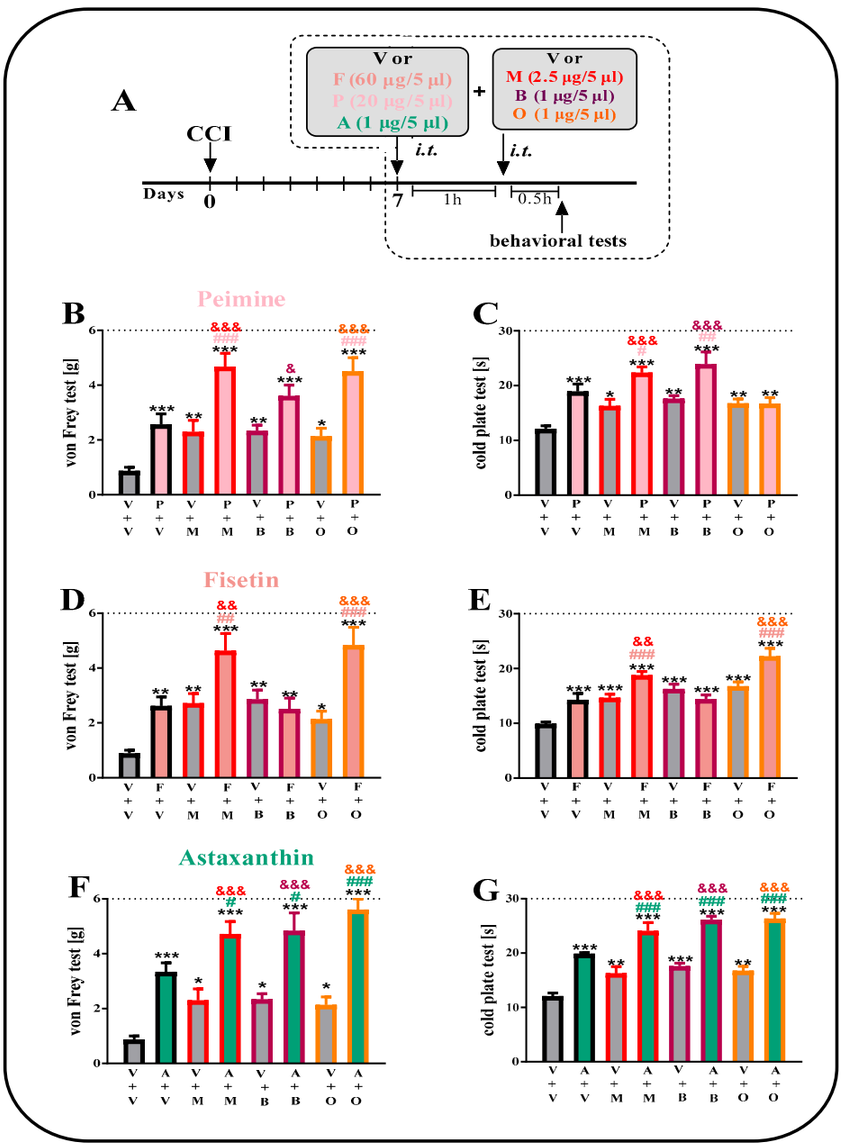


Figure 4. Pharmacological modulation by nonselective, mitogen-activated protein kinase inhibitors influences opioid effectiveness (**A**–**G**) in a neuropathic pain model. After 1 h, the single vehicle-, peimine- (20 µg/5 µL), fisetin- (60 µg/5 µL) or astaxanthin- (1 µg/5 µL)-treated mice received a single dose of vehicle, morphine (2.5 µg/5 µL), buprenorphine (1 µg/5 µL) or oxycodone (1 µg/5 µL), and von Frey (**B**,**D**,**F**) and cold plate (**C**,**G**,**E**) tests were conducted 30 min later. The data are presented as means ± SEMs (V + V n = 6–7; P + V n = 6; V + M n = 5–7; P + M n = 6; V + B n = 6–7; P + B n = 5; V + O n = 6–7; P + O n = 6; F + V n = 6–7; F + M n = 7; F + B n = 7; F + O n = 6; A + V n = 6; A + M n = 7; A + B n = 6; A + O n = 5). The horizontal dotted line shows the cutoff values. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ indicate differences compared with V + V-treated CCI-exposed mice; $^{\&}$ $p < 0.05$, $^{\&\&}$ $p < 0.01$ and $^{\&\&\&}$ $p < 0.001$ indicate differences between the V + M/B/O- and P/F/A + M/B/O-treated CCI-exposed mice; and $^{\#}$ $p < 0.05$, $^{\#\#}$ $p < 0.01$ and $^{\#\#\#}$ $p < 0.001$ indicates differences between the P/F/A + V- and P/F/A + M/B/O-treated CCI-exposed mice. Abbreviations: Ar, artemisinin; P, peimine; F, fisetin; A, astaxanthin; M, morphine; B, buprenorphine; O, oxycodone; V, vehicle; CCI, chronic constriction injury.

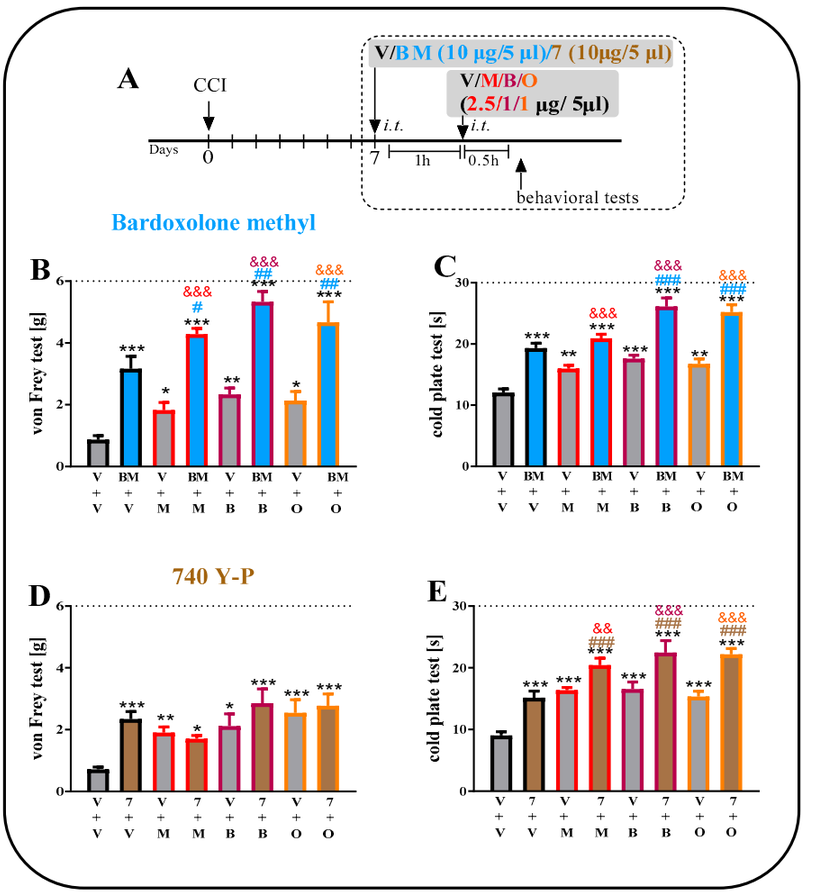


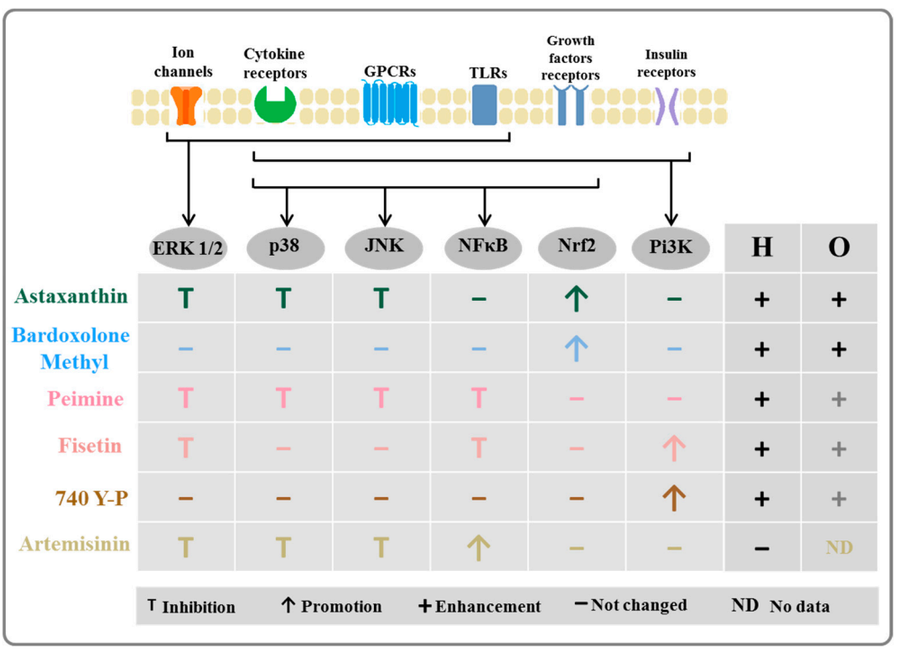
Figure 5. Pharmacological modulation by Nrf2 and Pi3K activators influences opioid effectiveness (**A**–**E**) in a neuropathic pain model. After 1 h, the single vehicle-, bardoxolone methyl- (10 µg/5 µL; (**B**,**C**)) or 740 Y-P- (10 µg/5 µL; (**D**,**E**))-treated mice received a single dose of vehicle, morphine (2.5 µg/5 µL), buprenorphine (1 µg/5 µL) or oxycodone (1 µg/5 µL), and von Frey (**B**,**D**) and cold plate (**C**,**E**) tests were conducted 30 min later. The data are presented as means ± SEMs (V + V n = 6–7; BM + V n = 6–7; V + M n = 6–8; BM + M n = 7; V + B n = 6–7; BM + B n = 6; V + O n = 6–7; BM + O n = 6; 7 + V n = 7; 7 + M n = 8; 7 + B n = 7; 7 + O n = 7). The horizontal dotted line shows the cutoff values. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ indicate differences compared with V + V-treated CCI-exposed mice; $^{\&\&}$ $p < 0.01$ and $^{\&\&\&}$ $p < 0.001$ indicate differences between the V + M/B/O- and BM/7 + M/B/O-treated CCI-exposed mice; and $^{\#}$ $p < 0.05$, $^{\#\#}$ $p < 0.01$ and $^{\#\#\#}$ $p < 0.001$ indicate differences between the BM/7 + V- and BM/7 + M/B/O-treated CCI-exposed mice. Abbreviations: BM, bardoxolone methyl; 7, 740 Y-P; B, buprenorphine; M, morphine; O, oxycodone; V, vehicle; CCI, chronic constriction injury.

The administration of morphine, buprenorphine or oxycodone preceded by injection of bardoxolone methyl resulted in a more effective attenuation of tactile ($F_{(7, 40)} = 12.13$; $p < 0.0001$) (Figure 5B) and thermal ($F_{(7, 39)} = 23{,}70$; $p < 0.0001$) (Figure 5C) hypersensitivity. The injection of all tested opioids preceded by treatment with 740 Y-P resulted in a more effective attenuation of thermal ($F_{(7, 48)} = 11{,}85$; $p < 0.0001$) hypersensitivity (Figure 5E), but had no influence on tactile hypersensitivity (Figure 5D).

3. Discussion

This study showed that among the nonselective MAPK modulators, fisetin, peimine and astaxanthin effectively diminished tactile and thermal hypersensitivity in mice after

nerve injury, while artemisinin did not exert analgesic potency in the model of neuropathic pain used (Scheme 1).



Scheme 1. Modulators of intracellular kinases and transcription factors and their influence on pain hypersensitivity (H) and opioid analgesia (O) in mice exposed to CCI.

For the first time, both of the activators tested, bardoxolone methyl and 740 Y-P, also showed analgesic effects after intrathecal administration in mice exposed to sciatic nerve injury. The results of our research clearly indicate that substances that inhibit all three MAPKs provide pain relief, especially if they additionally block NF-κB, such as peimine, activate PI3K, such as fisetin, and activate Nrf2, such as astaxanthin, the most effective substance in our research (Scheme 1).

Considering that some of the substances used have the status of dietary supplements, further research, both experimental and clinical, in light of such promising results, is undoubtedly recommended. Importantly, the results of our research indicate that substances such as peimine, fisetin, bardoxolone methyl and especially astaxanthin increase the effectiveness of morphine, buprenorphine and/or oxycodone, which is an exceptionally important outcome from a clinical point of view. For our experiments, we selected substances that modulate intracellular pathways that are considered to participate in the development of hypersensitivity in neuropathy. Activation of p38 is regarded as crucial step in the development of neuroinflammation, and a growing amount of evidence has shown increased activation of this kinase at different levels of nociceptive pathways in various pain models [12,44–47]. Importantly, some experiments, including those performed by our group, revealed that intrathecal injection of selective inhibitors of p38, such as SB203580 [12,48,49] or FR167653 [50], diminished pain-related behavior in models of neuropathic pain. Notably, the first clinical trials were undertaken to assess the analgesic action of the potent p38 inhibitors dilmapimod (SB-681323) [51] and losmapimod (GW856553) [52] in patients suffering from neuropathic pain. The first appears to be promising; however, it merits further evaluation in larger clinical trials, particularly to estimate the size of analgesic effect. However, recently, experimental studies have provided evidence that nonselective substances with a broad spectrum of action appear to have great therapeutic potential, and one of them is minocycline, which, apart from being a p38 inhibitor, also impairs ERK1/2 and JNK signaling [53,54]. To date, minocycline has been shown to reduce

hypersensitivity in nerve injury- [55–57] and diabetic- [58]-evoked neuropathy and has become a promising therapeutic drug in the clinic [59]. ERK signaling is linked to potassium channel phosphorylation and changes in voltage-gated calcium channels of sensory neurons [59]. This was confirmed by pharmacological studies that showed that selective inhibitors of the ERK pathway, such as PD198306 [60], U0126 [15,61] and PD98059 [18,62], diminished pain-related behavior in models of neuropathy. In contrast to p38, which is mainly expressed in microglia/macrophages after nerve injury, JNK changes were detected in neurons and astrocytes [63,64]. Importantly, it was also proven that injection of the selective JNK inhibitors D-JNKI-1JNK or SP600125 prevented hypersensitivity in animals with neuropathic pain [65,66]. Since selective p38, ERK1/2 or JNK inhibitors have been shown to be effective in relieving neuropathic pain in animal models, we hypothesize that substances acting on the entire MAPK family and administered directly at the spinal cord level could be even more effective.

To our surprise, artemisinin, a sweet wormwood-derived compound that is considered to be an all-MAPK inhibitor [36,37], did not exert analgesic potency in CCI-exposed mice when administered intrathecally. In contrast, experiments performed by others indicate that this substance has analgesic potency in neuropathic [67] and inflammatory [68,69] pain, but only after repeated intraperitoneal administration, which suggests its divergent molecular mechanisms of action on the periphery. However, published data indicate that this compound additionally acts on the transcription factor NF-κB; however, some in vitro studies point to inhibitory [37] and others to stimulatory [38] effects. The lack of effectiveness of artemisinin in our studies suggests that its i.t. administration may cause unfavorable NF-κB activation in neuropathy; however, this requires additional investigation. To date, it is known that NF-κB plays an important role in nociceptive transmission since it regulates the synthesis of many pronociceptive factors that are upregulated after nerve injury [70–72]. Our previous results obtained by Western blot analysis have shown that after CCI in rats, the level of NF-κB is increased [18,73] and its inhibition by parthenolide diminishes hypersensitivity [15,73]. This is a possible explanation for why we obtained such good analgesic effects after i.t. administration of peimine, which is an inhibitor of all three MAPKs and NF-κB. We showed for the first time that this substance strongly reduces hypersensitivity to mechanical and thermal stimuli in mice exposed to CCI. The biological properties of peimine are still being explored, although its health-promoting effect has been known for a long time. The compound has been isolated from *Fritillaria*, a plant used in traditional Chinese medicine as an anti-inflammatory and analgesic remedy [74]; however, it is not yet recommended for therapy in Europe or the USA. Importantly, recent research shows that apart from blocking MAPK and NF-κB, peimine blocks the Nav1.7-gated sodium and Kv1.3 potassium channels [74], which might also contribute to its analgesic properties. Taking into account published data and the results obtained by us, we believe that peimine could be considered in the treatment of neuropathy, especially because it was recently pointed out that this substance targets nAChRs with high affinity, which might account for its anti-inflammatory actions [75]. Undoubtedly, further studies are necessary since preclinical and clinical outcomes are very promising.

Another very interesting substance that modulates MAPK and inhibits NF-κB is fisetin, a naturally occurring flavonoid [27]. In our studies, we have shown that this compound has an analgesic effect in mice subjected to CCI, even after a single injection. In 2015, it was proven that repeated fisetin treatment exerts an antinociceptive effect on thermal hypersensitivity in CCI-exposed mice [76]. It was also demonstrated by others that fisetin administration can delay diabetic neuropathic pain-related behavior in mice [77]. Importantly, fisetin also influences the PI3K/AKT/mTOR pathway, which is unique for its multiplicity of roles in the transcriptional regulation of genes important in the development of neuropathic pain. The latest research indicates that this substance acts as a PI3K activator [30,78]. Interestingly, in 2019, it was proven that resveratrol, another plant-derived compound, alleviated paclitaxel-induced neuropathic pain through activation of the PI3K/Akt pathway [79]. Therefore, to address these findings, in our study, we decided

to use a selective PI3K activator, namely, 740 Y-P, and for the first time, we showed that this substance diminished tactile and thermal hypersensitivity in CCI-exposed mice. This interesting result sheds new light on testing the effectiveness of substances that are activators of intracellular cascades in neuropathic pain.

Among the substances we tested, astaxanthin exerted the best analgesic effect in the CCI model of neuropathic pain. This is also indicated by the analysis of the ED_{50} values for each of the substances tested, according to which astaxanthin is effective at lower doses than the other substances (Table 1). Astaxanthin is a carotenoid found primarily in various plants, algae and seafood, and it exerts antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic properties [80]. It was previously hypothesized that astaxanthin could relieve neuropathic pain by spinal inhibition of ERK1/2, p38 and NF-κB activation in a spinal nerve ligation model [81]. Data from in vitro studies suggest that this substance reduces the oxidative stress induced by lipopolysaccharides in C6 glial cells [82]. Moreover, it was proposed that astaxanthin regulates IL-6 production through an ERK1/2-MSK-1- and NF-κB p65-dependent pathway [83]. Interestingly, a subsequent study indicated that CCI surgery evoked an increase in kynurenine (KYN)/tryptophan (TRY), a decrease in serotonin (5-HT)/TRY and a decrease in the 5-HT/5-HIAA ratio in the spinal cord, which was reversed by chronic astaxanthin treatment [84]. Additionally, astaxanthin decreased thermal hypersensitivity and attenuated comorbid depressive-like behaviors in CCI-exposed mice [84]. Recently, another intracellular molecule was also proposed as a target for astaxanthin—Nrf2 [85]. This transcription factor plays a role in maintaining redox status, inflammatory modulation, protein degeneration and biotransformation. According to the latest literature, Nrf2 downstream interactions lead to the transcription of several antioxidative enzymes that can ameliorate neuropathic pain in rodent models [86–88]. The newest studies indicate that the antinociceptive effects of Nrf2 occur by reducing oxidative stress, neuroinflammation, and mitochondrial dysfunction. Interestingly, in our experiments, bardoxolone methyl, which is a selective activator of Nrf2, reduced tactile and thermal hypersensitivity in mice exposed to CCI. These results correspond well with a study by others, which also pointed out the beneficial action of bardoxolone methyl in ischemic optic neuropathy and in diabetic neuropathy [89,90].

In recent years, much attention has been given to the importance of polytherapy in the treatment of neuropathic pain, which is why we decided to verify whether the nonselective inhibitors and selective activators used in our studies can improve the effectiveness of opioid drugs in neuropathy. Opioids are considered to be a second- or third-line class of analgesics that may provide relief to some patients with chronic pain; however, in neuropathy, their analgesic potential significantly weakens [91,92]. Out of all the substances tested in this study, the best results were obtained in the case of astaxanthin, which, after a single administration with morphine, buprenorphine or oxycodone, evoked better analgesic effects than each of these drugs alone in CCI-exposed mice. Importantly, for the first time, we have shown that a substance that is an inhibitor of all three MAPK kinases and an activator of Nrf2 has such spectacular effects. However, this is consistent with previously published literature that confirmed the involvement of MAPKs in the analgesic potency of opioids. It was shown that inhibition of p38 [93], ERK1/2 [15,18] and JNK [94,95] improves the analgesic effects of morphine in neuropathy. It has also been proven that PD98059 (MEK 1/2 inhibitor) enhances buprenorphine-induced analgesia under neuropathic pain [18]; however, there is a lack of studies addressing oxycodone effectiveness. The action of astaxanthin is intriguing also because this substance is an activator of Nrf2. The latest published data indicate that Nrf2 activators, i.e., 5-fluoro-2-oxindole [96] and sulforaphane [97] increase the effectiveness of morphine in neuropathy. Our research shows, for the first time, that the coadministration of a selective activator of Nrf2, bardoxolone methyl with morphine, buprenorphine or oxycodone, evokes better analgesic effects than opioids alone on the von Frey test, but not in the case of morphine on the cold plate test, which needs to be explained in the future. Another very interesting substance with strong analgesic potential is peimine, which inhibits MAPKs and NF-κB. In our previous studies, we demon-

strated that intrathecal injections of parthenolide (NF-κB inhibitor) significantly potentiate morphine analgesia in neuropathy [15,73]. Importantly, coinjection of peimine with opioids causes better attenuation of tactile hypersensitivity; however, we did not observe such effects for oxycodone in the case of thermal hypersensitivity, which remains to be clarified in additional experiments. Another tested substance, fisetin, which blocks ERK1/2 and is also an inhibitor of NF-κB and an activator of PI3K, improved the analgesic effects of morphine and oxycodone in both tests; however, it did not influence buprenorphine action. The possible explanation of this may be due to the different mechanisms of action of these opioids: morphine and oxycodone are strong MOR agonists [98,99], while buprenorphine is a MOR partial agonist, DOR and KOR antagonist and NOR strong agonist [100]. The reason that fisetin has a different effect on buprenorphine analgesia requires further research, but it might be related to the fact that it is a PI3K activator, and our experiments indicate that a selective PI3K activator did not influence the analgesic effectiveness of any of the opioids used on the von Frey test but evoked better analgesic effects on the cold plate test when coadministered with these opioids. This very interesting result might suggest that PI3K activation might have greater importance for the functioning of Aδ and C fibers, which are responsible for thermal sensation [101], with less impact on Aβ fibers, which are responsible for tactile hypersensitivity [102]. Additionally, published data indicate that rather than activation, the blockade of PI3K attenuated the development of morphine tolerance in mice with neuropathy [95,103]. Therefore, more studies are needed to explain the role of PI3K in neuropathic pain and opioid effectiveness. Importantly, our research shows that although the selective PI3K activator effectively relieves pain, it does not increase opioid analgesia.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

Male albino Swiss mice (20–22 g) were purchased from Charles River (Hamburg, Germany) and housed in cages with sawdust bedding on a standard 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 06.00 a.m.), with food and water available ad libitum. All of the procedures were performed in accordance with the recommendations of the International Association for the Study of Pain (IASP) [104] and the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Ethics Committee of the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences (LKE 218/2018, 319/2021, 99/2022). Care was taken to minimize animal suffering and reduce the number of animals used in the experiments (3R policy)—the total number of mice used in our study was 429.

4.2. Neuropathic Pain Model

Mice were exposed to chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve under isoflurane anesthesia, according to the procedure described by Bennett and Xie [105]. An incision was made below the right hipbone, and the biceps femoris and gluteus superficialis were separated. The sciatic nerve was exposed, and three ligatures (4/0 silk sutures) spaced 1 mm apart were tied loosely around the nerve distal to the sciatic notch until a brief twitch was elicited in the respective hind limb. CCI is a standard procedure that has been used in our laboratory for many years to induce neuropathic pain-related behavior in rodents [106–108]. On day 7 after surgery, all CCI-exposed mice fully developed tactile and thermal hypersensitivity compared to naïve animals as measured by the von Frey test ($p < 0.0001$) and the cold plate test ($p < 0.0001$) at all studied time points.

4.3. Behavioral Tests

4.3.1. Von Frey Test

Tactile hypersensitivity was measured using calibrated nylon monofilaments of increasing strength (0.6 to 6 g; 6 g is the cutoff latency) (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) to observe reactions to mechanical stimuli, as described previously [106]. The animals were placed in plastic cages with a wire mesh floor 5 min before the experiment, and von Frey filaments were applied to the midplantar surface of the right hind paw until the hind paw

was lifted. In naïve animals, both hind paws were tested in the same way. This is a test used regularly in our laboratory [107,109,110].

4.3.2. Cold Plate Test

Thermal hypersensitivity was assessed using a cold plate analgesia meter (Ugo Basile, Gemonio, Italy), as described previously [109]. The temperature of the cold plate was kept at 2 °C, and the cutoff latency was 30 s. The mice were placed on the cold plate separately, and the latency to lift the hind paw was recorded. In naïve animals, both hind paws were observed simultaneously. In CCI-exposed mice, the injured paw reacted first to the cold stimulus. This is a test used regularly in our laboratory [107,109,110].

4.4. Pharmacological Study

4.4.1. Drugs and Routes of Administration

The following compounds were used in our experiments: fisetin (F; Cayman, Ann Arbor, MI, USA), peimine (P; Sigma-Aldrich, St Louis, USA), artemisinin (Ar; Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), astaxanthin (A; Sigma-Aldrich, St Louis, USA), bardoxolone methyl (BM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), 740 Y-P (7; Med Chem Express, Monmouth Junction, NJ, USA), morphine hydrochloride (M; Fagron, Krakow, Poland), buprenorphine (B; Polfa S.A., Warsaw, Poland) and oxycodone hydrochloride (O; Molteni Farmaceutici, Scandicci, Italy). All of these substances were administered via intrathecal injection (i.t.), a standard procedure in our laboratory [109,111]. It is performed by using a Hamilton syringe with a thin needle in accordance with instructions described previously [112]. The injections were performed in the lumbar segment of the spinal cord (between the L5 and L6 vertebrae) with a volume of 5 µL, and the tail reflex was an indicator of correct administration.

4.4.2. Dose-Dependence Study

All intracellular pathway modulators were dissolved in 60% DMSO (reconstituted in water for injection) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) and administered i.t. Artemisinin at doses of 1, 5, and 10 µg/5 µL; peimine at doses of 10, 20, and 60 µg/5 µL; fisetin at doses of 20, 60, 120, and 240 µg/5 µL; astaxanthin at doses of 0.5, 1, and 2 µg/5 µL; bardoxolone methyl at doses of 5, 10 and 20 µg/5 µL; and 740 Y-P at doses of 1, 5, 10, and 20 µg/5 µL were each administered on day 7 after CCI. Behavioral tests were performed 0.5, 1.5, 3, 5 and 24 h after injections in each case. The time points were selected based on our previous behavioral studies.

4.4.3. Administration with Opioids

Based on the results of the dose-dependence study, we selected doses of each substance for combined administration with opioids. On day 7 after CCI, single i.t. injections of fisetin (60 µg/5 µL), peimine (20 µg/5 µL), astaxanthin (1 µg/5 µL), bardoxolone methyl (10 µg/5 µL) or 740 Y-P (10 µg/5 µL) were performed. Then, after 1 h, the vehicle- and intracellular pathway modulator-treated mice received a single i.t. injection of morphine (2.5 µg/5 µL), buprenorphine (1 µg/5 µL), oxycodone (1 µg/5 µL) or control (water for injections). Each pharmacological tool was combined with each of the opioid drugs tested in the experiment. Behavioral tests were conducted 0.5 h after opioid injections and 1.5 h after the first administration.

4.5. Data Analysis

The behavioral data are presented as means ± SEM in grams and seconds. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the experimental results, followed by Bonferroni's post hoc test of selected pairs measured separately at each time point. The results from Figures 1–3 were additionally evaluated using two-way ANOVA to detect time–drug interactions. All of the statistical analyses were performed using Prism (version 8.1.1 (330), GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Additionally, for comparison of the results obtained 1.5 h after drug administration, calculations

of ED_{50} and % MPE were performed. The Litchfield and Wilcoxon method was used to determine the antinociceptive dose necessary to produce a 50% response (ED_{50}) and the 95% confidence interval on the quantitative data, which was automatically calculated with Pharm/PCS software, version 4. The percentage of the maximal possible antinociceptive effect (%MPE ± SEM) was calculated according to the following equation: %MPE = [(TL − BL)/(CUT − OFF − BL)] × 100%, where BL was the baseline latency and TL was the latency obtained after drug injection. The differences were considered significant when $p < 0.05$.

5. Conclusions

In summary, in our opinion, the inhibitors of the intracellular pathways studied here bring satisfactory results, because they are multitarget substances directed at several factors that were previously implicated to be important for nociceptive processes. In our opinion, modern polypharmacology should include combinations of drugs with a broad spectrum of action. Our research results indicate that substances such as peimine (MAPK and NFκB inhibitor) and astaxanthin (MAPK inhibitor, Nrf2 activator), apart from their pain-relieving properties, also effectively enhance opioid analgesia in neuropathy. Undoubtedly, astaxanthin is one of the most promising substances, but the selective activator of Nrf2, bardoxolone methyl, seems to be worthy of further experiments. The results of our research demonstrate how important it is to test multitarget substances, especially those that are already broadly used as dietary supplements, because they are safe for human consumption. The modulators of intracellular pathways studied here, especially astaxanthin, bring promising results for the development of new, more effective therapeutic interventions, and continuation of this research will broaden our knowledge regarding the mechanisms of neuropathy.

Author Contributions: Conceptualization, K.C. and J.M.; methodology, K.C, E.R., K.P. and A.C.; validation, K.C., E.R., K.P., A.C. and J.M.; formal analysis, K.C.; investigation, K.C., E.R., K.P., A.C. and J.M.; resources, J.M.; data curation, K.C. and J.M.; writing—original draft preparation, K.C. and J.M.; writing—review and editing, K.C., E.R., K.P., A.C. and J.M.; visualization K.C. and J.M.; supervision, J.M.; project administration, J.M.; funding acquisition, J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by National Science Centre, Poland grants OPUS 22 2021/43/B/NZ7/00230 and statutory funds from the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences.

Institutional Review Board Statement: The number of animals was limited to the necessary minimum. Experiments were carried out according to the recommendations and standards of the International Association for the Study of Pain and the National Institutes of Health's *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and were approved by the Ethics Committee of the Maj Institute of Pharmacology of the Polish Academy of Sciences (permissions 218/2018, 319/2021, and 99/2022).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The English language was corrected by American Journal Experts (certificate F60A-6462-68F9-61BE-0B4E).

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Dworkin, R.H.; O'Connor, A.B.; Audette, J.; Baron, R.; Gourlay, G.K.; Haanpää, M.L.; Kent, J.L.; Krane, E.J.; Lebel, A.A.; Levy, R.M.; et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: An overview and literature update. *Mayo Clin. Proc.* **2010**, *85*, S3–S14. [CrossRef] [PubMed]
2. Van Hecke, O.; Austin, S.K.; Khan, R.A.; Smith, B.H.; Torrance, N. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. *Pain* **2014**, *155*, 654–662. [CrossRef]

3. Finnerup, N.B.; Attal, N.; Haroutounian, S.; McNicol, E.; Baron, R.; Dworkin, R.H.; Gilron, I.; Haanpää, M.; Hansson, P.; Jensen, T.S.; et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* **2015**, *14*, 162–173. [CrossRef]
4. Colloca, L.; Ludman, T.; Bouhassira, D.; Baron, R.; Dickenson, A.H.; Yarnitsky, D.; Freeman, R.; Truini, A.; Attal, N.; Finnerup, N.B.; et al. Neuropathic pain. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2017**, *3*, 17002. [CrossRef] [PubMed]
5. Mika, J.; Zychowska, M.; Popiolek-Barczyk, K.; Rojewska, E.; Przewlocka, B. Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *716*, 106–119. [CrossRef]
6. Tsuda, M. Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. *J. Diabetes Investig.* **2016**, *7*, 17–26. [CrossRef] [PubMed]
7. Inoue, K.; Tsuda, M. Microglia and neuropathic pain. *Glia* **2009**, *57*, 1469–1479. [CrossRef] [PubMed]
8. Popiolek-Barczyk, K.; Mika, J. Targeting the Microglial Signaling Pathways: New Insights in the Modulation of Neuropathic Pain. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 2908–2928. [CrossRef]
9. Ji, R.-R.; Suter, M.R. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol. Pain* **2007**, *3*, 33. [CrossRef]
10. Ji, R.R.; Gereau IV, R.W.; Malcangio, M.; Strichartz, G.R. MAP kinase and pain. *Brain Res. Rev.* **2009**, *60*, 135–148. [CrossRef]
11. Johnson, G.L.; Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **2002**, *298*, 1911–1912. [CrossRef] [PubMed]
12. Jin, S.X.; Zhuang, Z.Y.; Woolf, C.J.; Ji, R.R. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Activated after a Spinal Nerve Ligation in Spinal Cord Microglia and Dorsal Root Ganglion Neurons and Contributes to the Generation of Neuropathic Pain. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 4017. [CrossRef] [PubMed]
13. Obata, K.; Noguchi, K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci.* **2004**, *74*, 2643–2653. [CrossRef] [PubMed]
14. Ma, W.; Quirion, R. The ERK/MAPK pathway, as a target for the treatment of neuropathic pain. *Expert Opin. Ther. Targets* **2005**, *9*, 699–713. [CrossRef]
15. Popiolek-Barczyk, K.; Makuch, W.; Rojewska, E.; Pilat, D.; Mika, J. Inhibition of intracellular signaling pathways NF-κB and MEK1/2 attenuates neuropathic pain development and enhances morphine analgesia. *Pharmacol. Rep.* **2014**, *66*, 845–851. [CrossRef]
16. Qu, Y.J.; Jia, L.; Zhang, X.; Wei, H.; Yue, S.W. MAPK Pathways Are Involved in Neuropathic Pain in Rats with Chronic Compression of the Dorsal Root Ganglion. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2016**, *2016*, 6153215. [CrossRef]
17. Gao, Y.J.; Cheng, J.K.; Zeng, Q.; Xu, Z.Z.; Decosterd, I.; Xu, X.; Ji, R.R. Selective inhibition of JNK with a peptide inhibitor attenuates pain hypersensitivity and tumor growth in a mouse skin cancer pain model. *Exp. Neurol.* **2009**, *219*, 146–155. [CrossRef]
18. Rojewska, E.; Popiolek-Barczyk, K.; Kolosowska, N.; Piotrowska, A.; Zychowska, M.; Makuch, W.; Przewlocka, B.; Mika, J. PD98059 influences immune factors and enhances opioid analgesia in model of neuropathy. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138583. [CrossRef]
19. Chen, S.-P.; Zhou, Y.-Q.; Liu, D.-Q.; Zhang, W.; Manyande, A.; Guan, X.-H.; Tian, Y.; Ye, D.-W.; Omar, D.M. PI3K/Akt Pathway: A Potential Therapeutic Target for Chronic Pain. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 1860–1868. [CrossRef]
20. Liu, W.; Lv, Y.; Ren, F. PI3K/Akt Pathway is Required for Spinal Central Sensitization in Neuropathic Pain. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2018**, *38*, 747–755. [CrossRef]
21. Beg, A.A.; Baltimore, D. An Essential Role for NF-κB in Preventing TNF-α-Induced Cell Death. *Science* **1996**, *274*, 782–784. [CrossRef] [PubMed]
22. Wang, C.Y.; Mayo, M.W.; Baldwin, A.S. TNF- and Cancer Therapy-Induced Apoptosis: Potentiation by Inhibition of NF-κB. *Science* **1996**, *274*, 784–787. [CrossRef] [PubMed]
23. Berghe, W.V.; Plaisance, S.; Boone, E.; De Bosscher, K.; Schmitz, M.L.; Fiers, W.; Haegeman, G. p38 and Extracellular Signal-regulated Kinase Mitogen-activated Protein Kinase Pathways Are Required for Nuclear Factor-κB p65 Transactivation Mediated by Tumor Necrosis Factor. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 3285–3290. [CrossRef] [PubMed]
24. Pan, Y.D.; Guo, Q.L.; Wang, E.; Ye, Z.; He, Z.H.; Zou, W.Y.; Cheng, Z.G.; Wang, Y.J. Intrathecal infusion of pyrrolidine dithiocarbamate for the prevention and reversal of neuropathic pain in rats using a sciatic chronic constriction injury model. *Reg. Anesth. Pain Med.* **2010**, *35*, 231–237. [CrossRef]
25. Lee, M.K.; Han, S.R.; Park, M.K.; Kim, M.J.; Bae, Y.C.; Kim, S.K.; Park, J.S.; Ahn, D.K. Behavioral evidence for the differential regulation of p-p38 MAPK and p-NF-κB in rats with trigeminal neuropathic pain. *Mol. Pain* **2011**, *7*, 57. [CrossRef]
26. Zhou, Y.Q.; Mei, W.; Tian, X.B.; Tian, Y.K.; Liu, D.Q.; Ye, D.W. The therapeutic potential of Nrf2 inducers in chronic pain: Evidence from preclinical studies. *Pharmacol. Ther.* **2021**, *225*, 107846. [CrossRef]
27. Ren, Q.; Guo, F.; Tao, S.; Huang, R.; Ma, L.; Fu, P. Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF-κB p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *122*, 109772. [CrossRef]
28. Zhang, H.F.; Zhang, H.B.; Wu, X.P.; Guo, Y.L.; Cheng, W.D.; Qian, F. Fisetin alleviates sepsis-induced multiple organ dysfunction in mice via inhibiting p38 MAPK/MK2 signaling. *Acta Pharmacol. Sin.* **2020**, *41*, 1348–1356. [CrossRef]
29. Watanabe, R.; Kurose, T.; Morishige, Y.; Fujimori, K. Protective Effects of Fisetin Against 6-OHDA-Induced Apoptosis by Activation of PI3K-Akt Signaling in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Neurochem. Res.* **2018**, *43*, 488–499. [CrossRef]
30. Sundarraj, K.; Raghunath, A.; Panneerselvam, L.; Perumal, E. Fisetin Inhibits Autophagy in HepG2 Cells via PI3K/Akt/mTOR and AMPK Pathway. *Nutr. Cancer* **2021**, *73*, 2502–2514. [CrossRef]

31. Yi, P.F.; Wu, Y.C.; Dong, H.B.; Guo, Y.; Wei, Q.; Zhang, C.; Song, Z.; Qin, Q.Q.; Lv, S.; Wu, S.C.; et al. Peimine impairs pro-inflammatory cytokine secretion through the inhibition of the activation of NF-κB and MAPK in LPS-induced RAW264.7 macrophages. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2013**, *35*, 567–572. [CrossRef]
32. Li, Y.; Wang, Q.; Chu, C.; Liu, S. Astaxanthin protects retinal ganglion cells from acute glaucoma via the Nrf2/HO-1 pathway. *J. Chem. Neuroanat.* **2020**, *110*, 101876. [CrossRef]
33. Heidari Khoei, H.; Fakhri, S.; Parvardeh, S.; Shams Mofarahe, Z.; Baninameh, Z.; Vardiani, M. Astaxanthin prevents the methotrexate-induced reproductive toxicity by targeting oxidative stress in male mice. *Toxin Rev.* **2019**, *38*, 248–254. [CrossRef]
34. Eslami, M.; Esfandyari, S.; Aghahosseini, M.; Rashidi, Z.; Hosseinishental, S.; Brenjian, S.; Sobhani, A.; Amidi, F. Astaxanthin protects human granulosa cells against oxidative stress through activation of NRF2/ARE pathway and its downstream phase II enzymes. *Cell J.* **2021**, *23*, 319. [CrossRef]
35. Zhao, L.; Tao, X.; Wan, C.; Dong, D.; Wang, C.; Xi, Q.; Liu, Y.; Song, T. Astaxanthin alleviates inflammatory pain by regulating the p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-erythroid factor 2-related factor/heme oxygenase-1 pathways in mice. *Food Funct.* **2021**, *12*, 12381–12394. [CrossRef] [PubMed]
36. Li, Z.; Ding, X.; Wu, H.; Liu, C. Artemisinin inhibits angiogenesis by regulating p38 MAPK/CREB/TSP-1 signaling pathway in osteosarcoma. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 11462–11470. [CrossRef] [PubMed]
37. Wang, K.S.; Li, J.; Wang, Z.; Mi, C.; Ma, J.; Piao, L.X.; Xu, G.H.; Li, X.; Jin, X. Artemisinin inhibits inflammatory response via regulating NF-κB and MAPK signaling pathways. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2017**, *39*, 28–36. [CrossRef]
38. Zhao, X.; Huang, X.; Yang, C.; Jiang, Y.; Zhou, W.; Zheng, W. Artemisinin Attenuates Amyloid-Induced Brain Inflammation and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF-κB Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6354. [CrossRef] [PubMed]
39. Yates, M.S.; Tauchi, M.; Katsuoka, F.; Flanders, K.C.; Liby, K.T.; Honda, T.; Gribble, G.W.; Johnson, D.A.; Johnson, J.A.; Burton, N.C.; et al. Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 154–162. [CrossRef] [PubMed]
40. Wu, J.; Liu, X.; Fan, J.; Chen, W.; Wang, J.; Zeng, Y.; Feng, X.; Yu, X.; Yang, X. Bardoxolone methyl (BARD) ameliorates aristolochic acid (AA)-induced acute kidney injury through Nrf2 pathway. *Toxicology* **2014**, *318*, 22–31. [CrossRef]
41. Xu, B.; Li, J.; Xu, D.; Ran, Q. PLK4 inhibitor plus bortezomib exhibits a synergistic effect on treating multiple myeloma via inactivating PI3K/AKT signaling. *Ir. J. Med. Sci.* **2022**, *192*, 561–567. [CrossRef] [PubMed]
42. Deng, M.; Chen, S.R.; Chen, H.; Luo, Y.; Dong, Y.; Pan, H.L. Mitogen-activated protein kinase signaling mediates opioid-induced presynaptic NMDA receptor activation and analgesic tolerance. *J. Neurochem.* **2019**, *148*, 275–290. [CrossRef]
43. Tian, Y.; Liu, M.; Mao-Ying, Q.L.; Liu, H.; Wang, Z.F.; Zhang, M.T.; Wang, J.; Li, Q.; Liu, S.B.; Mi, W.L.; et al. Early single Aspirin-triggered Lipoxin blocked morphine anti-nociception tolerance through inhibiting NALP1 inflammasome: Involvement of PI3k/Akt signaling pathway. *Brain Behav. Immun.* **2015**, *50*, 63–77. [CrossRef] [PubMed]
44. Cui, X.Y.; Dai, Y.; Wang, S.L.; Yamanaka, H.; Kobayashi, K.; Obata, K.; Chen, J.; Noguchi, K. Differential activation of p38 and extracellular signal-regulated kinase in spinal cord in a model of bee venom-induced inflammation and hyperalgesia. *Mol. Pain* **2008**, *4*, 17. [CrossRef]
45. Crown, E.D.; Gwak, Y.S.; Ye, Z.; Johnson, K.M.; Hulsebosch, C.E. Activation of p38 MAP kinase is involved in central neuropathic pain following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* **2008**, *213*, 257–267. [CrossRef]
46. Milligan, E.D.; O'Connor, K.A.; Armstrong, C.B.; Hansen, M.K.; Martin, D.; Tracey, K.J.; Maier, S.F.; Watkins, L.R. Systemic administration of CNI-1493, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, blocks intrathecal human immunodeficiency virus-1 gp120-induced enhanced pain states in rats. *J. Pain* **2001**, *2*, 326–333. [CrossRef]
47. Cheng, K.I.; Wang, H.C.; Chuang, Y.T.; Chou, C.W.; Tu, H.P.; Yu, Y.C.; Chang, L.L.; Lai, C.S. Persistent mechanical allodynia positively correlates with an increase in activated microglia and increased P-p38 mitogen-activated protein kinase activation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pain* **2014**, *18*, 162–173. [CrossRef] [PubMed]
48. Tsuda, M.; Mizokoshi, A.; Shigemoto-Mogami, Y.; Koizumi, S.; Inoue, K. Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Spinal Hyperactive Microglia Contributes to Pain Hypersensitivity Following Peripheral Nerve Injury. *Glia* **2004**, *45*, 89–95. [CrossRef]
49. Rojewska, E.; Popiolek-Barczyk, K.; Jurga, A.M.; Makuch, W.; Przewlocka, B.; Mika, J. Involvement of pro- and antinociceptive factors in minocycline analgesia in rat neuropathic pain model. *J. Neuroimmunol.* **2014**, *277*, 57–66. [CrossRef]
50. Wen, Y.R.; Suter, M.R.; Kawasaki, Y.; Huang, J.; Pertin, M.; Kohno, T.; Berde, C.B.; Decosterd, I.; Ji, R.R. Nerve conduction blockade in the sciatic nerve prevents but does not reverse the activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia in the rat spared nerve injury model. *Anesthesiology* **2007**, *107*, 312–321. [CrossRef]
51. Anand, P.; Shenoy, R.; Palmer, J.E.; Baines, A.J.; Lai, R.Y.K.; Robertson, J.; Bird, N.; Ostenfeld, T.; Chizh, B.A. Clinical trial of the p38 MAP kinase inhibitor dilmapimod in neuropathic pain following nerve injury. *Eur. J. Pain* **2011**, *15*, 1040–1048. [CrossRef] [PubMed]
52. Ostenfeld, T.; Krishen, A.; Lai, R.Y.; Bullman, J.; Green, J.; Anand, P.; Scholz, J.; Kelly, M. A randomized, placebo-controlled trial of the analgesic efficacy and safety of the p38 MAP kinase inhibitor, losmapimod, in patients with neuropathic pain from lumbosacral radiculopathy. *Clin. J. Pain* **2015**, *31*, 283–293. [CrossRef] [PubMed]
53. Piotrowska, A.; Popiolek-Barczyk, K.; Pavone, F.; Mika, J. Comparison of the Expression Changes after Botulinum Toxin Type A and Minocycline Administration in Lipopolysaccharide-Stimulated Rat Microglial and Astroglial Cultures. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 141. [CrossRef]

54. Ciechanowska, A.; Rojewska, E.; Piotrowska, A.; Barut, J.; Pawlik, K.; Ciapała, K.; Kreiner, G.; Mika, J. New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions—Evidence from animal studies. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 1058204. [CrossRef] [PubMed]
55. Mika, J.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Przewlocka, B. Minocycline reduces the injury-induced expression of prodynorphin and pronociceptin in the dorsal root ganglion in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* **2010**, *165*, 1420–1428. [CrossRef]
56. Mika, J.; Osikowicz, M.; Makuch, W.; Przewlocka, B. Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *560*, 142–149. [CrossRef]
57. Mika, J.; Wawrzczak-Bargiela, A.; Osikowicz, M.; Makuch, W.; Przewlocka, B. Attenuation of morphine tolerance by minocycline and pentoxifylline in naïve and neuropathic mice. *Brain Behav. Immun.* **2009**, *23*, 75–84. [CrossRef]
58. Zychowska, M.; Rojewska, E.; Kreiner, G.; Nalepa, I.; Przewlocka, B.; Mika, J. Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. *J. Neuroimmunol.* **2013**, *262*, 35–45. [CrossRef]
59. Zhou, Y.Q.; Liu, D.Q.; Chen, S.P.; Sun, J.; Wang, X.M.; Tian, Y.K.; Wu, W.; Ye, D.W. Minocycline as a promising therapeutic strategy for chronic pain. *Pharmacol. Res.* **2018**, *134*, 305–310. [CrossRef]
60. Ciruela, A.; Dixon, A.K.; Bramwell, S.; Gonzalez, M.I.; Pinnock, R.D.; Lee, K. Identification of MEK1 as a novel target for the treatment of neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *138*, 751–756. [CrossRef]
61. Han, M.; Huang, R.Y.; Du, Y.M.; Zhao, Z.Q.; Zhang, Y.Q. Early intervention of ERK activation in the spinal cord can block initiation of peripheral nerve injury-induced neuropathic pain in rats. *Sheng Li Xue Bao* **2011**, *63*, 106–114. [PubMed]
62. Zhuang, Z.Y.; Gerner, P.; Woolf, C.J.; Ji, R.R. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* **2005**, *114*, 149–159. [CrossRef] [PubMed]
63. Ma, W.; Quirion, R. Partial sciatic nerve ligation induces increase in the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in astrocytes in the lumbar spinal dorsal horn and the gracile nucleus. *Pain* **2002**, *99*, 175–184. [CrossRef] [PubMed]
64. Tang, J.; Zhu, C.; Li, Z.H.; Liu, X.Y.; Sun, S.K.; Zhang, T.; Luo, Z.J.; Zhang, H.; Li, W.Y. Inhibition of the spinal astrocytic JNK/MCP-1 pathway activation correlates with the analgesic effects of tanshinone IIA sulfonate in neuropathic pain. *J. Neuroinflammation* **2015**, *12*, 57. [CrossRef] [PubMed]
65. Zhuang, Z.Y.; Wen, Y.R.; Zhang, D.R.; Borsello, T.; Bonny, C.; Strichartz, G.R.; Decosterd, I.; Ji, R.R. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: Respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 3551–3560. [CrossRef]
66. He, N.; Qu, Y.J.; Li, D.Y.; Yue, S.W. RIP3 Inhibition ameliorates chronic constriction injury-induced neuropathic pain by suppressing JNK signaling. *Aging* **2021**, *13*, 24417–24431. [CrossRef]
67. Ying, M.; Liu, H.; Zhang, T.; Jiang, C.; Gong, Y.; Wu, B.; Zou, L.; Yi, Z.; Rao, S.; Li, G.; et al. Effect of artemisinin on neuropathic pain mediated by P2X4 receptor in dorsal root ganglia. *Neurochem. Int.* **2017**, *108*, 27–33. [CrossRef]
68. Dehkordi, F.M.; Kaboutari, J.; Zendehdel, M.; Javdani, M. The antinociceptive effect of artemisinin on the inflammatory pain and role of GABAergic and opioidergic systems. *Korean J. Pain* **2019**, *32*, 160–167. [CrossRef]
69. Elisei, L.M.S.; Moraes, T.R.; Malta, I.H.; Charlie-Silva, I.; Sousa, I.M.O.; Veras, F.P.; Foglio, M.A.; Fraceto, L.F.; Galdino, G. Antinociception induced by artemisinin nanocapsule in a model of postoperative pain via spinal TLR4 inhibition. *Inflammopharmacology* **2020**, *28*, 1537–1551. [CrossRef]
70. Zhang, W.; Wang, F.; Zhang, L.; Sun, T.; Fu, Z. Intrathecal injection of ozone alleviates CCI-induced neuropathic pain via the GluR6-NF-κB/p65 signalling pathway in rats. *Mol. Med. Rep.* **2021**, *23*, 231. [CrossRef]
71. Xu, L.; Liu, Y.; Sun, Y.; Li, H.; Mi, W.; Jiang, Y. Analgesic effects of TLR4/NF-κB signaling pathway inhibition on chronic neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *107*, 526–533. [CrossRef]
72. Miao, J.; Zhou, X.; Ji, T.; Chen, G. NF-κB p65-dependent transcriptional regulation of histone deacetylase 2 contributes to the chronic constriction injury-induced neuropathic pain via the microRNA-183/TXNIP/NLRP3 axis. *J. Neuroinflammation* **2020**, *17*, 225. [CrossRef] [PubMed]
73. Popiolek-Barczyk, K.; Kolosowska, N.; Piotrowska, A.; Makuch, W.; Rojewska, E.; Jurga, A.M.; Pilat, D.; Mika, J. Parthenolide Relieves Pain and Promotes M2 Microglia/Macrophage Polarization in Rat Model of Neuropathy. *Neural Plast.* **2015**, *2015*, 676473. [CrossRef] [PubMed]
74. Xu, J.; Zhao, W.; Pan, L.; Zhang, A.; Chen, Q.; Xu, K.; Lu, H.; Chen, Y. Peimine, a main active ingredient of Fritillaria, exhibits anti-inflammatory and pain suppression properties at the cellular level. *Fitoterapia* **2016**, *111*, 1–6. [CrossRef] [PubMed]
75. Alberola-Die, A.; Encinar, J.A.; Cobo, R.; Fernández-Ballester, G.; González-Ros, J.M.; Ivorra, I.; Morales, A. Peimine, an Anti-Inflammatory Compound from Chinese Herbal Extracts, Modulates Muscle-Type Nicotinic Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11287. [CrossRef] [PubMed]
76. Zhao, X.; Wang, C.; Cui, W.G.; Ma, Q.; Zhou, W.H. Fisetin exerts antihyperalgesic effect in a mouse model of neuropathic pain: Engagement of spinal serotonergic system. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, srep09043. [CrossRef]

77. Zhao, X.; Li, X.L.; Liu, X.; Wang, C.; Zhou, D.S.; Ma, Q.; Zhou, W.H.; Hu, Z.Y. Antinociceptive effects of fisetin against diabetic neuropathic pain in mice: Engagement of antioxidant mechanisms and spinal GABAA receptors. *Pharmacol. Res.* **2015**, *102*, 286–297. [CrossRef] [PubMed]
78. Pal, H.C.; Athar, M.; Elmets, C.A.; Afaq, F. Fisetin inhibits UVB-induced cutaneous inflammation and activation of PI3K/AKT/NFκB signaling pathways in SKH-1 hairless mice. *Photochem. Photobiol.* **2015**, *91*, 225–234. [CrossRef]
79. Li, X.; Yang, S.; Wang, L.; Liu, P.; Zhao, S.; Li, H.; Jiang, Y.; Guo, Y.; Wang, X. Resveratrol inhibits paclitaxel-induced neuropathic pain by the activation of pi3k/akt and sirti/pgcia pathway. *J. Pain Res.* **2019**, *12*, 879–890. [CrossRef] [PubMed]
80. Si, P.; Zhu, C. Biological and neurological activities of astaxanthin (Review). *Mol. Med. Rep.* **2022**, *26*, 300. [CrossRef]
81. Zhao, L.; Tao, X.; Song, T. Astaxanthin alleviates neuropathic pain by inhibiting the MAPKs and NF-κB pathways. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, *912*, 174575. [CrossRef]
82. Sharma, K.; Sharma, D.; Sharma, M.; Sharma, N.; Bidve, P.; Prajapati, N.; Kalia, K.; Tiwari, V. Astaxanthin ameliorates behavioral and biochemical alterations in in-vitro and in-vivo model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.* **2018**, *674*, 162–170. [CrossRef] [PubMed]
83. Kim, Y.H.; Koh, H.K.; Kim, D.S. Down-regulation of IL-6 production by astaxanthin via ERK-, MSK-, and NF-κB-mediated signals in activated microglia. *Int. Immunopharmacol.* **2010**, *10*, 1560–1572. [CrossRef]
84. Jiang, X.; Yan, Q.; Liu, F.; Jing, C.; Ding, L.; Zhang, L.; Pang, C. Chronic trans-astaxanthin treatment exerts antihyperalgesic effect and corrects co-morbid depressive like behaviors in mice with chronic pain. *Neurosci. Lett.* **2018**, *662*, 36–43. [CrossRef] [PubMed]
85. Wu, Q.; Zhang, X.S.; Wang, H.D.; Zhang, X.; Yu, Q.; Li, W.; Zhou, M.L.; Wang, X.L. Astaxanthin activates nuclear factor erythroid-related factor 2 and the antioxidant responsive element (nrf2-are) pathway in the brain after subarachnoid hemorrhage in rats and attenuates early brain injury. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 6125–6141. [CrossRef] [PubMed]
86. Feng, F.B.; Qiu, H.Y. Neuroprotective effect of tanshinone IIA against neuropathic pain in diabetic rats through the Nrf2/ARE and NF-κB signaling pathways. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **2018**, *34*, 428–437. [CrossRef]
87. Sun, J.; Li, J.Y.; Zhang, L.Q.; Li, D.Y.; Wu, J.Y.; Gao, S.J.; Liu, D.Q.; Zhou, Y.Q.; Mei, W. Nrf2 Activation Attenuates Chronic Constriction Injury-Induced Neuropathic Pain via Induction of PGC-1 α -Mediated Mitochondrial Biogenesis in the Spinal Cord. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, *2021*, 1–17. [CrossRef]
88. Zhou, Y.Q.; Liu, D.Q.; Chen, S.P.; Chen, N.; Sun, J.; Wang, X.M.; Cao, F.; Tian, Y.K.; Ye, D.W. Nrf2 activation ameliorates mechanical allodynia in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Acta Pharmacol. Sin.* **2020**, *41*, 1041–1048. [CrossRef]
89. Kalvala, A.K.; Kumar, R.; Sherkhane, B.; Gundu, C.; Arruri, V.K.; Kumar, A. Bardoxolone Methyl Ameliorates Hyperglycemia Induced Mitochondrial Dysfunction by Activating the keap1-Nrf2-ARE Pathway in Experimental Diabetic Neuropathy. *Mol. Neurobiol.* **2020**, *57*, 3616–3631. [CrossRef]
90. Chien, J.Y.; Chou, Y.Y.; Ciou, J.W.; Liu, F.Y.; Huang, S.P. The effects of two Nrf2 activators, bardoxolone methyl and omaveloxolone, on retinal ganglion cell survival during ischemic optic neuropathy. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1466. [CrossRef]
91. Schembri, E. Are Opioids Effective in Relieving Neuropathic Pain? *SN Compr. Clin. Med.* **2019**, *1*, 30–46. [CrossRef]
92. Kwiatkowski, K.; Mika, J. The importance of chemokines in neuropathic pain development and opioid analgesic potency. *Pharmacol. Rep.* **2018**, *70*, 821–830. [CrossRef]
93. Wen, Y.R.; Tan, P.H.; Cheng, J.K.; Liu, Y.C.; Ji, R.R. Microglia: A promising target for treating neuropathic and postoperative pain, and morphine tolerance. *J. Formos. Med. Assoc.* **2011**, *110*, 487–494. [CrossRef] [PubMed]
94. Hervera, A.; Leánez, S.; Pol, O. The inhibition of the nitric oxide-cGMP-PKG-JNK signaling pathway avoids the development of tolerance to the local antiallodynic effects produced by morphine during neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *685*, 42–51. [CrossRef] [PubMed]
95. Okerman, T.; Jurgenson, T.; Moore, M.; Klein, A.H. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase-AKT-cyclic GMP-c-Jun N-terminal kinase signaling pathway attenuates the development of morphine tolerance in a mouse model of neuropathic pain. *Mol. Pain* **2021**, *17*, 17448069211003375. [CrossRef]
96. Ferreira-Chamorro, P.; Redondo, A.; Riego, G.; Pol, O. Treatment with 5-fluoro-2-oxindole Increases the Antinociceptive Effects of Morphine and Inhibits Neuropathic Pain. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2021**, *41*, 995–1008. [CrossRef]
97. Ferreira-Chamorro, P.; Redondo, A.; Riego, G.; Leánez, S.; Pol, O. Sulforaphane inhibited the nociceptive responses, anxiety—And depressive-like behaviors associated with neuropathic pain and improved the anti-allodynic effects of morphine in mice. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1332. [CrossRef]
98. Corbett, A.D.; Paterson, S.J.; Kosterlitz, H.W. Selectivity of Ligands for Opioid Receptors. In *Opioids*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1993; pp. 645–679. [CrossRef]
99. Nasseef, M.T.; Singh, J.P.; Ehrlich, A.T.; McNicholas, M.; Park, D.W.; Ma, W.; Kulkarni, P.; Kieffer, B.L.; Darcq, E. Oxycodone-Mediated Activation of the Mu Opioid Receptor Reduces Whole Brain Functional Connectivity in Mice. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2019**, *2*, 264–274. [CrossRef]
100. Gudin, J.; Fudin, J. A Narrative Pharmacological Review of Buprenorphine: A Unique Opioid for the Treatment of Chronic Pain. *Pain Ther.* **2020**, *9*, 41. [CrossRef] [PubMed]
101. Ji, G.; Zhou, S.; Kochukov, M.Y.; Westlund, K.N.; Carlton, S.M. Plasticity in intact A delta- and C-fibers contributes to cold hypersensitivity in neuropathic rats. *Neuroscience* **2007**, *150*, 182–193. [CrossRef]
102. Baba, H.; Doubell, T.P.; Woolf, C.J. Peripheral Inflammation Facilitates Aβ Fiber-Mediated Synaptic Input to the Substantia Gelatinosa of the Adult Rat Spinal Cord. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 859. [CrossRef]

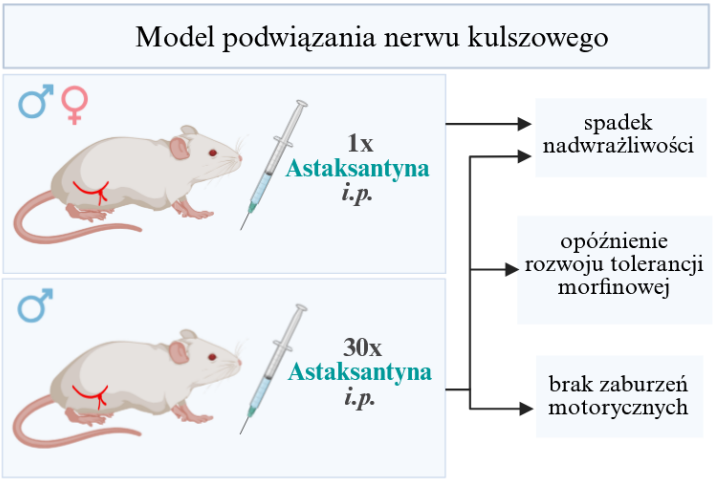
103. Khan, M.I.; Momeny, M.; Ostadhadi, S.; Jahanabadi, S.; Ejtemaei-Mehr, S.; Sameem, B.; Zarrinrad, G.; Dehpour, A.R. Thalidomide attenuates development of morphine dependence in mice by inhibiting PI3K/Akt and nitric oxide signaling pathways. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2018**, *82*, 39–48. [CrossRef]
104. Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **1983**, *16*, 109–110. [CrossRef] [PubMed]
105. Bennett, G.J.; Xie, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **1988**, *33*, 87–107. [CrossRef] [PubMed]
106. Rojewska, E.; Ciapała, K.; Mika, J. Kynurenic acid and zaprinast diminished CXCL17-evoked pain-related behaviour and enhanced morphine analgesia in a mouse neuropathic pain model. *Pharmacol. Rep.* **2019**, *71*, 139–148. [CrossRef] [PubMed]
107. Piotrowska, A.; Ciapała, K.; Pawlik, K.; Kwiatkowski, K.; Rojewska, E.; Mika, J. Comparison of the effects of chemokine receptors CXCR2 and CXCR3 pharmacological modulation in neuropathic pain model—In vivo and in vitro study. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11074. [CrossRef]
108. Bogacka, J.; Ciapała, K.; Pawlik, K.; Kwiatkowski, K.; Dobrogowski, J.; Przeklasa-Muszynska, A.; Mika, J. CCR4 Antagonist (C021) Administration Diminishes Hypersensitivity and Enhances the Analgesic Potency of Morphine and Buprenorphine in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1241. [CrossRef]
109. Ciechanowska, A.; Pawlik, K.; Ciapała, K.; Mika, J. Pharmacological Modulation of the MIP-1 Family and Their Receptors Reduces Neuropathic Pain Symptoms and Influences Morphine Analgesia: Evidence from a Mouse Model. *Brain Sci.* **2023**, *13*, 579. [CrossRef]
110. Kwiatkowski, K.; Ciapała, K.; Rojewska, E.; Makuch, W.; Mika, J. Comparison of the beneficial effects of RS504393, maraviroc and cenicriviroc on neuropathic pain-related symptoms in rodents: Behavioral and biochemical analyses. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *84*, 106540. [CrossRef]
111. Kwiatkowski, K.; Popiolek-Barczyk, K.; Piotrowska, A.; Rojewska, E.; Ciapała, K.; Makuch, W.; Mika, J. Chemokines CCL2 and CCL7, but not CCL12, play a significant role in the development of pain-related behavior and opioid-induced analgesia. *Cytokine* **2019**, *119*, 202–213. [CrossRef]
112. Fairbanks, C.A. Spinal delivery of analgesics in experimental models of pain and analgesia. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 1007–1041. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4.5. Zbadanie wpływu wielokrotnych dootrzewnowych podań astaksantyny na nadwrażliwość oraz rozwój tolerancji morfinowej u myszy w modelu bólu neuropatycznego – *praca oryginalna* Ciapała i wsp., *Neurotherapeutics*, 2025

Nasze poprzednie badania wykazały, że astaksantyna podana podpajęczynówkowo skutecznie redukuje nadwrażliwość na bodźce dotykowe i termiczne u myszy w modelu neuropatii wywołanej podwiązaniem nerwu kulszowego, a jej zastosowanie w połączeniu z lekami opioidowymi prowadzi do efektywniejszego hamowania nadwrażliwości bólowej (Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2023[171]). Uznaliśmy to za istotną informację w kontekście klinicznym, gdyż długotrwałe stosowanie leków opioidowych często wiąże się z rozwojem tolerancji i koniecznością zwiększania dawek tych leków[189]. Dostępne dane literaturowe sugerowały, że za te efekty mogą odpowiadać różne mechanizmy, wśród których szczególnie ważne wydały się nam modulacja MAPK[212] oraz aktywacja czynnika transkrypcyjnego Nrf2[213]. Dlatego też kolejnym etapem naszych badań była ocena wpływu dootrzewnowych podań astaksantyny na nadwrażliwość dotykową i termiczną u myszy po uszkodzeniu nerwu kulszowego, a także analiza jej wpływu na rozwój tolerancji morfinowej oraz poszukiwanie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw obserwowanych korzystnych efektów tej substancji.

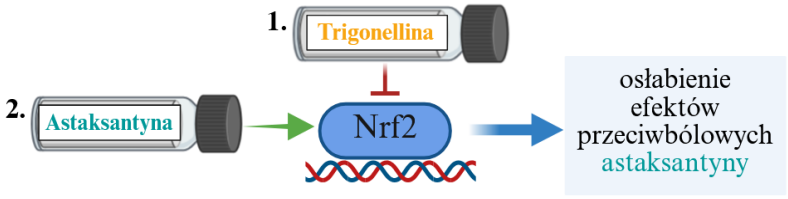
Wykazaliśmy, że pojedyncze dootrzewnowe podanie astaksantyny znacząco obniża nadwrażliwość dotykową i termiczną zarówno u samców, jak i samic. Po raz pierwszy zaobserwowaliśmy również, że wielokrotne podawanie tej substancji prowadzi do długotrwałego efektu przeciwbólowego, utrzymującego się przez cały okres prowadzenia testów behawioralnych, a ponadto opóźnia rozwój tolerancji morfinowej i zapobiega wystąpieniu zaburzeń motorycznych u zwierząt (**Rycina 8**). Ponadto astaksantyna stosowana samodzielnie wykazuje silniejsze działanie analgetyczne niż morfina, natomiast ich jednoczesne podanie skuteczniej redukuje nadwrażliwość w porównaniu z samą morfiną. Co było szczególnie zaskakujące, w badaniach biochemicznych wykazaliśmy, że astaksantyna — w przeciwieństwie do minocykliny[32,214] — podawana wielokrotnie dootrzewnowo nie wpływa na ekspresję markerów aktywacji mikrogleju/makrofagów (Iba-1) i astrocytów (GFAP) na poziomie rdzenia kręgowego. Co więcej, nie zaobserwowaliśmy również zmian w fosforylacji białek rodziny MAPK i ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Wykazaliśmy natomiast po raz pierwszy, że astaksantyna zwiększa ekspresję białka Nrf2 w rdzeniu kręgowym. Aby potwierdzić zaangażowanie tego czynnika w działanie przeciwbólowe astaksantyny, przeprowadziliśmy badania farmakologiczne, obejmujące podpajęczynówkowe podania astaksantyny wraz z trigonelliną (inhibitorem Nrf2) u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego. Nasze wyniki udowadniają, że sama trigonellina nie wpływa na nadwrażliwość



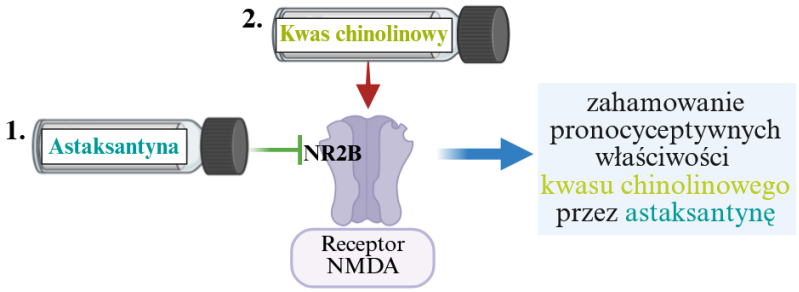
Rycina 8. *Wyniki eksperymentów behawioralnych po podaniach astaksantyny w modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego.*

bólową zwierząt, natomiast zahamowanie Nrf2 ogranicza przeciwbólowy efekt astaksantyny, co podkreśla rolę tego czynnika transkrypcyjnego w jej mechanizmie działania (**Rycina 9**). Ponieważ efekt ten był mniej wyraźny w przypadku bodźca dotykowego, zdecydowaliśmy się na dalsze poszukiwanie mechanizmów stojących u podstaw efektywności astaksantyny w neuropatii.

W najnowszych badaniach dokowania molekularnego *in silico* zasugerowano, że astaksantyna może wiązać się z kieszenią hamującą podjednostkę NR2B receptora NMDA[215]. Podjednostka ta odgrywa kluczową rolę w rozwoju i utrzymywaniu się bólu neuropatycznego, a jej podwyższoną ekspresję wykazano w rogach grzbietowych rdzenia kręgowego u szczurów[216]. Co ważne, nasze badania biochemiczne wykazały, że wielokrotne podania astaksantyny powodują istotny spadek ekspresji NR2B na poziomie rdzenia kręgowego, co zainspirowało nas do przeprowadzenia kolejnych eksperymentów. W badaniach behawioralnych u myszy bez podwiązywania nerwu kulszowego (naive), dowiedliśmy jako pierwsi, że podpajęczynówkowe podanie astaksantyny zapobiega rozwojowi nadwrażliwości bólowej indukowanej przez kwas chinolinowy (agonistę podjednostek NR2A i NR2B receptora NMDA), co wskazuje - biorąc pod uwagę dostępne wcześniejsze wyniki z badań *in silico* – że w bólu neuropatycznym jednym z mechanizmów działania astaksantyny jest blokowanie podjednostki NR2B receptora NMDA (**Rycina 10**). Podobny mechanizm działania w łagodzeniu nadwrażliwości na bodźce termiczne i mechaniczne obserwuje się w przypadku ketaminy, stosowanej w klinice w terapii przewlekłych zespołów bólowych[217].



Rycina 9. *Zastosowanie trigonelliny, inhibitora Nrf2 przed podaniem astaksantyny powoduje osłabienie jej przeciwbólowego działania .*
Legenda: *⊤-inhibitor, ↑-aktywacja*



Rycina 10. *Zastosowanie astaksantyny przed podaniem kwasu chinolinowego, będącego agonistą NR2A/B powoduje zahamowanie właściwości pronocyceptywnych tego kwasu.*
Legenda: *⊤-inhibitor, ↑-aktywacja*

Podsumowując, wykonane eksperymenty wykazały, że podanie dootrzewnowe astaksantyny zmniejsza nadwrażliwość bólową u samców i samic, nie powodując deficytów motorycznych, oraz zapobiega rozwojowi tolerancji morfinowej w mysim modelu bólu neuropatycznego. Wyniki naszych badań po raz pierwszy wskazują, że za działanie przeciwbólowe astaksantyny w neuropatii odpowiada jej zdolność do aktywacji Nrf2 oraz blokowania podjednostki NR2B receptora NMDA. Wyniki te otwierają nowe perspektywy w zrozumieniu mechanizmów efektu analgetycznego tej substancji. Podkreślają również, że astaksantyna może stanowić obiecujący, potencjalny środek terapeutyczny w leczeniu bólu neuropatycznego, zarówno stosowana samodzielnie, jak i w skojarzeniu z morfiną.

Neurotherapeutics 22 (2025) e00765

Contents lists available at ScienceDirect

Neurotherapeutics

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/neurotherapeutics

Original Article

Promising effects of astaxanthin on pain-related behaviors and morphine tolerance in a mouse model of neuropathic pain: Possible involvement of Nrf2 and the NMDA receptor subunit NR2B

Katarzyna Ciapała, Katarzyna Pawlik, Agata Ciechanowska, Wioletta Makuch, Joanna Mika*

Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences, Department of Pain Pharmacology, 12 Smetna Street, 31-343 Krakow, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Astaxanthin
Neuropathic pain
Morphine tolerance
Nrf2
NMDA subunit NR2B

ABSTRACT

The search for new analgesics remains an important issue because therapy for neuropathic pain is still ineffective. Astaxanthin is a naturally derived compound with well-established antiinflammatory and antioxidant properties; however, its pain-relieving mechanisms are not fully understood, and its potential to improve morphine efficacy in neuropathic pain remains poorly defined. This study investigated the effect of astaxanthin on pain-related behaviors in male and female mice, as well as its impact on morphine tolerance and to elucidate the molecular mechanism of its action in neuropathy evoked by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve. A single intraperitoneal injection of astaxanthin reduced pain-related behaviors similarly in both sexes after CCI. Importantly, repeated, twice-daily intraperitoneal astaxanthin administration delayed morphine tolerance and prevented motor disturbance. Notably, astaxanthin administered alone induced a long-lasting decrease in hypersensitivity, even to a greater extent than morphine. Western blot results indicated that astaxanthin altered Nrf2 and NR2B proteins expression, suggesting that these factors are involved in analgesic effects of this substance. Pharmacological studies in mice supported these findings: first, the intrathecal administration of trigonelline (an Nrf2 inhibitor) prior to astaxanthin injection caused the loss of its analgesic effect in a CCI model; second, the intrathecal administration of astaxanthin followed by quinolinic acid (an NMDA receptor agonist) prevented the development of hypersensitivity in naive animals. In sum, these results indicate a novel mechanism of analgesic action of astaxanthin, involving Nrf2 and NMDA receptor signaling, and highlight its therapeutic potential in the treatment of neuropathic pain.

Intraperitoneal administration of astaxanthin to mice with neuropathy:

- causes pain relief in males and females after a single injection
- leads to delay of morphine tolerance development
- evokes considerable, longer-lasting pain relief than morphine after repeated treatment
- brings beneficial analgesic properties mediated through Nrf2 and NR2B

Introduction

Neuropathic pain is a complex and often devastating condition that affects 7–10 % of individuals worldwide [1]. It is generally described as a shooting, burning, or electric shock-like sensation. The treatment of neuropathic pain remains challenging, mostly because commonly used medications are only partially effective, and new pharmacological tools have some limitations for use in humans [2]. As a result, management of neuropathic pain typically requires a multimodal approach that combines pharmacological and non-pharmacological strategies. Pharmacological treatment remains the cornerstone of therapy and is based on established guidelines, with first-line agents including certain antidepressants and anticonvulsants [3]. In cases where these methods are

* Corresponding author.
E-mail address: joamika@if-pan.krakow.pl (J. Mika).

https://doi.org/10.1016/j.neurot.2025.e00765
Received 23 June 2025; Received in revised form 25 September 2025; Accepted 28 September 2025
1878-7479/© 2025 Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences. Published by Elsevier Inc. on behalf of American Society for Experimental NeuroTherapeutics. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

insufficient, strong opioids are recommended; however, the rapid development of tolerance necessitates increasing doses, thereby complicating long-term management and increasing the risk of side effects [4]. For these reasons, extended studies to identify new targets as well as effective and safe agents for the treatment of neuropathic pain are constantly needed to provide satisfactory analgesic outcomes and improve patients' quality of life.

The challenges clinicians encounter in selecting appropriate therapies result primarily from the intricate and still not fully known mechanisms underlying neuropathic pain. Current knowledge indicates the leading roles of not only neurons but also glial cells in this phenomenon, as microglia become rapidly activated after nerve injury and release proinflammatory cytokines that enhance neuronal hyperexcitability, while astrocytes contribute to the maintenance and amplification of neuropathic pain [5]. Recent studies have focused on the involvement of different intracellular signaling cascades [5–9]. Studies conducted over the past two decades have highlighted the significant role of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) [10–21], which influence sensitization [19,22–25] and opioid effectiveness [26–30]. The MAPK family consists of p38 mitogen-activated protein kinase (p38), extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) [17,31,32]. To date, several studies have shown that selective MAPK inhibitors attenuate pain-related behaviors in animal models [24, 33,34]. In addition, the latest data indicate that among the intracellular mediators of the cellular response, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) or nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) are other important pharmacological targets for neuropathic pain relief [35–38]. Furthermore, for many years, the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor has been considered a key player not only in hypersensitivity development [39] but also in the effectiveness of morphine [29,40]. Particular emphasis has been placed on the NR2B subunit of this receptor, since its antagonists may have clinical utility for the treatment of neuropathic pain [41,42]. Oxidative stress has also recently been shown to play a significant role in the development of neuropathic pain, and the use of polymersomes containing superoxide dismutase (Sod) may prevent its onset [43].

As shown above, many different processes and mechanisms may be involved in the development of neuropathic pain, but, interestingly, the compound that seems to influence all the above-mentioned factors is astaxanthin, 3,3′-dihydroxy-beta, beta-carotene-4,4′-dione, which is naturally occurring carotenoid that belong to the xanthophyll family [9]. Astaxanthin may offer potential advantages for treating conditions such as arthritis, diabetes, heart diseases, chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome, reflux, inflammatory diseases and neurodegenerative illnesses [44–55]. Initial reports from preclinical studies also indicate that astaxanthin may alleviate symptoms of neuropathic pain in rodents; however, these studies were only conducted in males and did not explore the molecular effect of this substance on long-term morphine treatment [56–61]. Previous experiments performed by our team for the first time have shown that a single intrathecal administration of astaxanthin attenuates nerve injury-induced hypersensitivity and enhances the efficacy of morphine [57]. Although several potential mechanisms have been proposed to explain the analgesic effect of astaxanthin, the influences of its repeated administration on the development of hypersensitivity after nerve injury, as well as on the efficacy of morphine in a repeated-dose regimen, remain unclear and these aspects are particularly relevant from a clinical perspective.

The first step of this study was to evaluate and compare the effects of a single intraperitoneal injection of astaxanthin on mechanical and thermal hypersensitivity following chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in male and female mice. Subsequently, two pharmacological experiments employing distinct administration protocols were conducted to assess the effects of repeated astaxanthin treatment on pain-related behaviors, the development of morphine tolerance, and motor coordination in CCI-exposed male mice. Furthermore, alterations in the mRNA and/or protein expression levels of cellular markers, such as Iba-1 (microglia/macrophages), Gfap (astrocytes), and cFos (neurons), as well as other factors implicated in neuropathy such as pp38, pERK1/2, pJNK, pNFκB, Nrf2, Sod1 and NR2B, were examined in the spinal cord. The next part of this study focused on the experimental verification of the role of Nrf2 in the analgesic effect of astaxanthin by administering an inhibitor of Nrf2, trigonelline, to male mice subjected to CCI. Moreover, additional behavioral experiments were also performed to evaluate the role of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the pain-relieving actions of astaxanthin by administering quinolinic acid, an agonist of this receptor, to naive mice.

Materials and methods

Animals

Male and female albino Swiss mice (weighing 20–22 g) were purchased from Charles River (Hamburg, Germany). The mice were housed in cages lined with sawdust and maintained on a standard 12-h light/dark cycle (lights on at 6:00 a.m.) with an enriched environment and continuous access to food and water. All the experimental procedures adhered to the guidelines established by the International Association for the Study of Pain and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Approval was obtained from the II Local Ethics Committee of the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences (permit numbers: LKE 75/2023; 18/2023; 153/2023; 242/2024; and 243/2024). In accordance with the 3R principle, all efforts were made to reduce the number of animals used in the experiments and minimize animal suffering.

Neuropathic pain model

Chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve was induced in mice under isoflurane anesthesia using the methodology established by Bennett and Xie [62]. An incision was made below the right hip, and the *biceps femoris* and *gluteus superficialis* muscles were carefully separated to expose the sciatic nerve. Three loosely tied ligatures (4/0 silk sutures), spaced 1 mm apart, were placed around the nerve distal to the sciatic notch until a brief twitch was observed in the corresponding hind limb. CCI is a well-established procedure that has been performed in our laboratory since 2003 to induce neuropathic pain-related behaviors in rodents [57,63–65]. Compared with control (naive) animals, all mice subjected to CCI exhibited significant mechanical and thermal hypersensitivity, as observed using the von Frey test ($p < 0.0001$) and the cold plate test ($p < 0.0001$), at all evaluated time points.

Behavioral tests

von Frey test

Mechanical hypersensitivity was measured using calibrated nylon monofilaments of increasing strength (0.6–6 g; with 6 g as the cutoff latency) (Ugo Basile, Gemonio, Italy) to observe reactions to mechanical stimuli, as described previously [64]. The mice were habituated in plastic cages with a wire mesh floor 5 min before the experiment, and von Frey filaments were applied to the midplantar surface of the hind paw until the limb was lifted. In naive animals, both hind paws were tested in the same manner. This test is used regularly in our laboratory [64,66].

Cold plate test

Thermal hypersensitivity was measured using a cold plate analgesia meter (Ugo Basile, Gemonio, Italy), as described previously [64,67]. The temperature of the cold plate was maintained at 2 °C, and the cutoff latency was 30 s. The mice were positioned on the cold plate separately, and the time to lift the hind paw was noted. In CCI-exposed mice, the injured foot was the first to react to the cold stimulus. In naive mice,

both hind paws were observed simultaneously. This test is also used regularly in our laboratory [57,66].

Rotarod test

The rotarod test is a frequently used method to assess motor coordination in animals and was used in our previous studies [60]. The mice were placed in separate compartments on a horizontal rod that rotated at an accelerating speed, starting at 2 rpm and reaching 40 rpm within 300 s. The animals were acclimated to the apparatus and trained on the rotating rod. The time until the mouse fell off the rod was recorded. The rotarod test was conducted as a part of the repeated administration study, 1 h after morphine administration on Day 11. The cutoff latency was 300 s.

Pharmacological study

Substances and routes of administration

The following pharmacological tools were used in our experiments: astaxanthin (A; MedChemExpress, Monmouth Junction, USA), morphine hydrochloride (M; Fagron, Krakow, Poland), trigonelline (T; MedChemExpress), and quinolinic acid (Q; Tocris, Bristol, UK). Substances were administered *via* intrathecal (*i.t.*) or intraperitoneal (*i.p.)* injection. In the case of *i.p.* administration, the control groups for astaxanthin-treated mice received a 30 % solution of propylene glycol, and injections were performed in accordance with available guidelines by appropriately adjusting the doses according to the individual body weight measurements [68]. The control groups for morphine-treated mice received water for injection. In case of *i.t* administrations, control groups received the corresponding vehicles: 60 % dimethyl sulfoxide for astaxanthin-treated mice and water for injection for trigonelline or quinolinic acid-treated groups. This route of administration is a standard procedure in our laboratory [57,69]. The procedure was performed using a Hamilton syringe fitted with a fine-gauge needle, in accordance with established protocols described previously [70]. The injections were delivered in the lumbar segment of the spinal cord (between the L5 and L6 vertebrae) in a volume of 5 µl, with the tail reflex serving as an indicator of successful administration. All control groups were tested at the same time points as the corresponding experimental groups.

Dose dependency study

Astaxanthin was administered *i.p.* at doses of 1, 10, 25 or 50 mg/kg on Day 7 after CCI to both male and female mice. These doses were selected based on our previous studies and the available literature [57, 60,71]. The behavioral tests were conducted 0.5, 1.5, 3, 5 and 24 h after these injections.

Repeated astaxanthin administration in CCI-exposed mice after the development of morphine tolerance

Experiments were conducted in male mice subjected to CCI on Day 0 to evaluate the effects of astaxanthin on pain-related behaviors in animals that had developed morphine tolerance. Beginning on Day 1, mice received *i.p.* injections of either vehicle or morphine (30 mg/kg) twice daily, in the morning and afternoon (schemes A on Figs. 2 and 3). Behavioral assessments were performed every second day, 30 min after the morning injection. On Day 8, a decrease in morphine effectiveness was noted. On the morning of Day 9, morphine-treated animals were divided into two groups: one received the vehicle and the other received astaxanthin (25 mg/kg, *i.p.*), followed by morphine administration 30 min later in both groups. Similarly, animals that had received vehicle treatment up to Day 8 were divided into two groups on Day 9: one received astaxanthin followed by vehicle 30 min later, while the other group received vehicle at both time points, with the same interval between administrations. Behavioral testing was conducted 30 min after the second injection. The afternoon injection schedule remained the same, although no behavioral testing was performed. This regimen of drug administration and testing continued for the next 8 days.

Repeated administration of astaxanthin with morphine in CCI-exposed mice

Experiments were conducted in male mice subjected to CCI, using an alternative administration regimen to evaluate whether astaxanthin administered prior to the onset of morphine tolerance delays or prevents the development of this phenomenon (schemes A on Figs. 4 and 5). Tolerance development was evaluated by administering either vehicle or morphine (30 mg/kg, *i.p.*) twice daily for 14 days, starting on the first day after CCI, following a previously described protocol [72,73]. In the experimental groups, vehicle or astaxanthin (25 mg/kg, *i.p.*) was administered 16 and 1 h prior to CCI, and subsequently twice daily, 30 min before each vehicle or morphine injection, for the following 14 days. Behavioral testing was conducted daily, 30 min after the morning administration of vehicle or morphine. Additionally, on Day 11, the rotarod test was performed to assess motor coordination of the animals.

A single intrathecal injection of astaxanthin preceded by a trigonelline injection in CCI-exposed mice

To determine whether the analgesic effect of astaxanthin in neuropathic pain depends on the transcription factor Nrf2, male mice were administered its inhibitor, trigonelline (5 µg/5 µl, *i.t.*), or vehicle on Day 7 after CCI. Then, 30 min later, vehicle or astaxanthin (2 µg/5 µl, *i.t.*) was administered, and behavioral assessments were conducted at 0.5, 1.5, 3, 5, and 24 h after the last injection (scheme A on Fig. 10). The dose of trigonelline was selected based on a previously published study [74].

A single intrathecal quinolinic acid injection preceded by an astaxanthin injection in naive mice

To assess whether the analgesic effects of astaxanthin are mediated through mechanisms involving the NMDA receptor, naive mice received a single *i.t.* injection of the NMDA receptor agonist quinolinic acid (10 µg/5 µl) or vehicle. This injection was preceded by a single *i.t.* administration of vehicle or astaxanthin (2 µg/5 µl), given 30 min earlier. Behavioral assessments were performed at 0.5, 1.5, 3, 5, and 24 h after the administration of quinolinic acid (scheme A on Fig. 11). The dose of quinolinic acid was selected based on our preliminary experiments.

Analysis of gene expression via reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction

Immediately following decapitation, the ipsilateral (right) lumbar spinal cord segments (L4–L6) were dissected from CCI-exposed mice on Day 9 after CCI, approximately 4 h after the administration of vehicle or morphine. In the case of naive animals, the corresponding spinal cord regions were collected at the same time point to ensure consistency across experimental conditions. In accordance with the Chomczynski and Sacchi protocol [75], total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA). The quality and concentration of RNA were checked using a DeNovix DS-11 spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, USA). RNase inhibitor (Promega, Mannheim, Germany), an Omniscript RT Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) and oligo (dT16) primers (Qiagen Inc.) were used to perform reverse transcription of 1 µg of total RNA at 37 °C. Next, the obtained cDNA templates were diluted 1:10 with RNase-/DNase-free H_2O. RT–qPCR was performed with approximately 50 ng of cDNA template from each sample using Assay-On-Demand TaqMan probes (Applied Biosystems, Foster City, USA) and an iCycler device (Bio-Rad, Hercules, Warsaw, Poland). The following TaqMan primers were used: *Iba-1* (Mm00479862_g1), *Gfap* (Mm01253033_m1), *cFos* (Mm00487425_m1), *Sod1* (Mm01302428_m1), *Nrf2* (Mm00477784_m1), *Grin2b* (Mm00433820_m1) and *Hprt* (Mm00446968_m1). *Hprt* was used as an endogenous control and an adequate housekeeping gene. The cycle threshold values were automatically calculated using CFX Manager

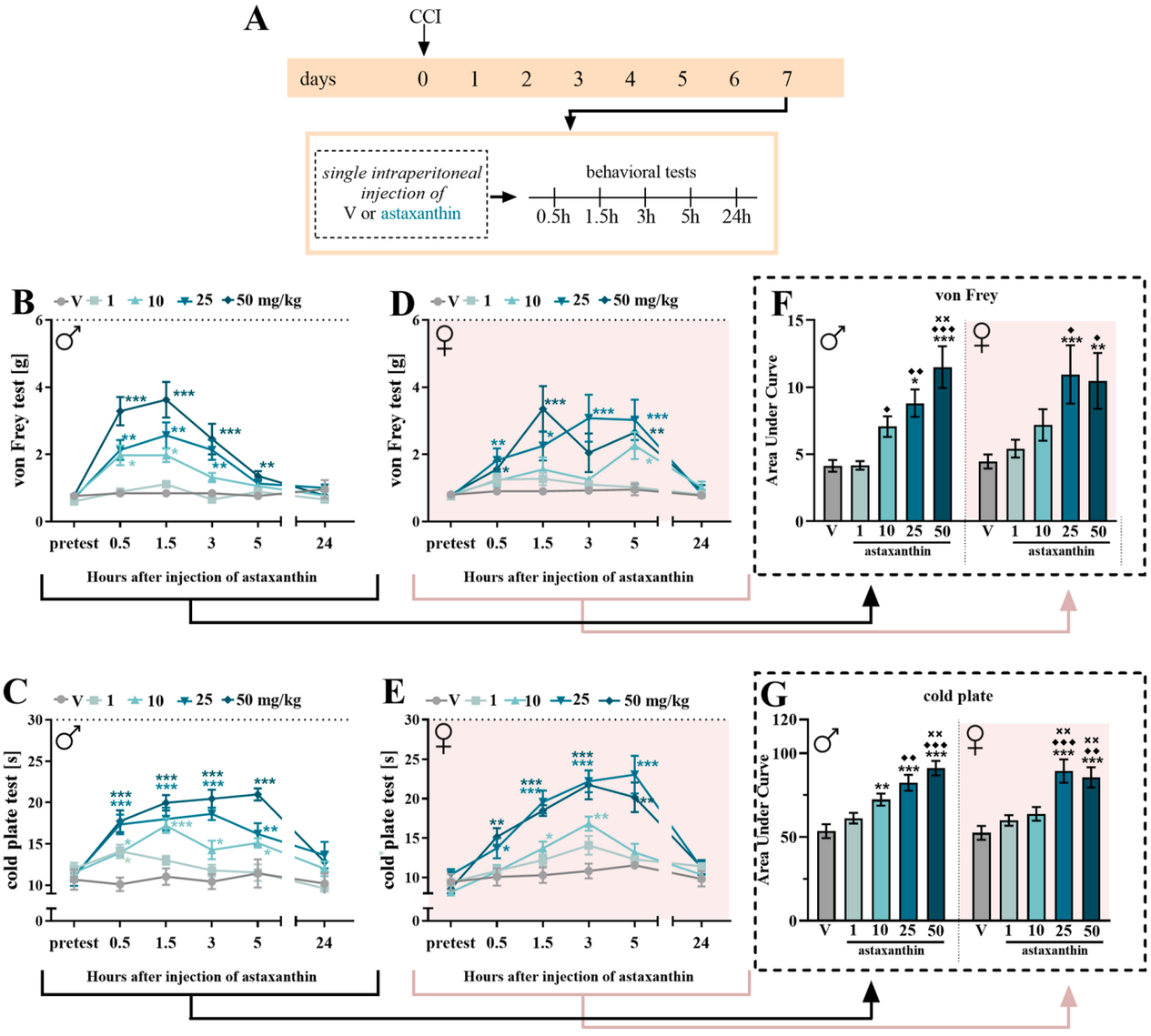


Fig. 1. Influence of *i.p.* astaxanthin administration on pain-related behaviors in male and female mice exposed to CCI. The effects of injections of vehicle and astaxanthin (1, 10, 25 and 50 mg/kg) on mechanical and thermal hypersensitivity were assessed at 0.5, 1.5, 3, 5 and 24 h after treatment on the 7th day after CCI (A) in males (B, C) and females (D, E). The data are presented as the means ± SEMs, and the numbers of animals are as follows: males, V = 5, 1 mg/kg = 7, 10 mg/kg = 7, 25 mg/kg = 6, and 50 mg/kg = 7; females, V = 8, 1 mg/kg = 8, 10 mg/kg = 8, 25 mg/kg = 8, and 50 mg/kg = 8. Additionally, the results obtained from the von Frey **(B, D)** and cold plate **(C, E)** tests were analyzed by calculating the areas under the curves **(F, G)** to visualize overall changes in the efficacy of the different doses. The intergroup differences were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ and ***$p < 0.001$ indicate differences between V-treated CCI mice and substance-treated CCI mice; ◆$p < 0.05$, ◆◆$p < 0.01$ and ◆◆◆$p < 0.001$ indicate differences between animals treated with astaxanthin at a dose of 1 mg/kg; $p < 0.01$ indicates differences between animals treated with astaxanthin at a dose of 10 mg/kg. The dotted lines indicate the cutoff values for the tests. Abbreviations: V, vehicle; CCI, chronic constriction injury.

v.2.1 software (Bio-Rad) with the default parameters. The RNA content was calculated using formula $2^{-(\text{threshold cycle})}$.

Analysis of protein levels via Western blotting

Immediately following decapitation, the ipsilateral (right) lumbar spinal cord segments (L4–L6) were dissected from CCI-exposed mice on Day 9, approximately 6 h after last substances administration. In the case of naive animals, the corresponding spinal cord regions were collected at the same time point to ensure consistency across experimental conditions. The samples were then placed in RIPA buffer supplemented with a protease/phosphatase inhibitor cocktail (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA), homogenized and cleared *via* centrifugation (14 000 rpm, 30 min at 4 °C). The total protein concentration was determined using the bicinchoninic acid method. The obtained samples (10 µg of protein) were heated in a mixture of loading buffer (4x Laemmli Buffer, Bio-Rad) and 2-mercaptoethanol (Bio-Rad) for 8 min at 98 °C. Using 4–15 % Criterion™ TGX™ precast polyacrylamide gels (Bio-Rad), electrophoresis was performed. Next, the proteins were transferred (semidry transfer at 25 V for 30 min) to Immune-Blot PVDF membranes (Bio-Rad) and blocked at RT for 1 h with 5 % bovine serum albumin (Sigma–Aldrich) in Tris-buffered saline containing 0.1 % Tween-20 (TBST). Following the blocking step, the membranes were washed with TBST and incubated overnight (4 °C) with the following

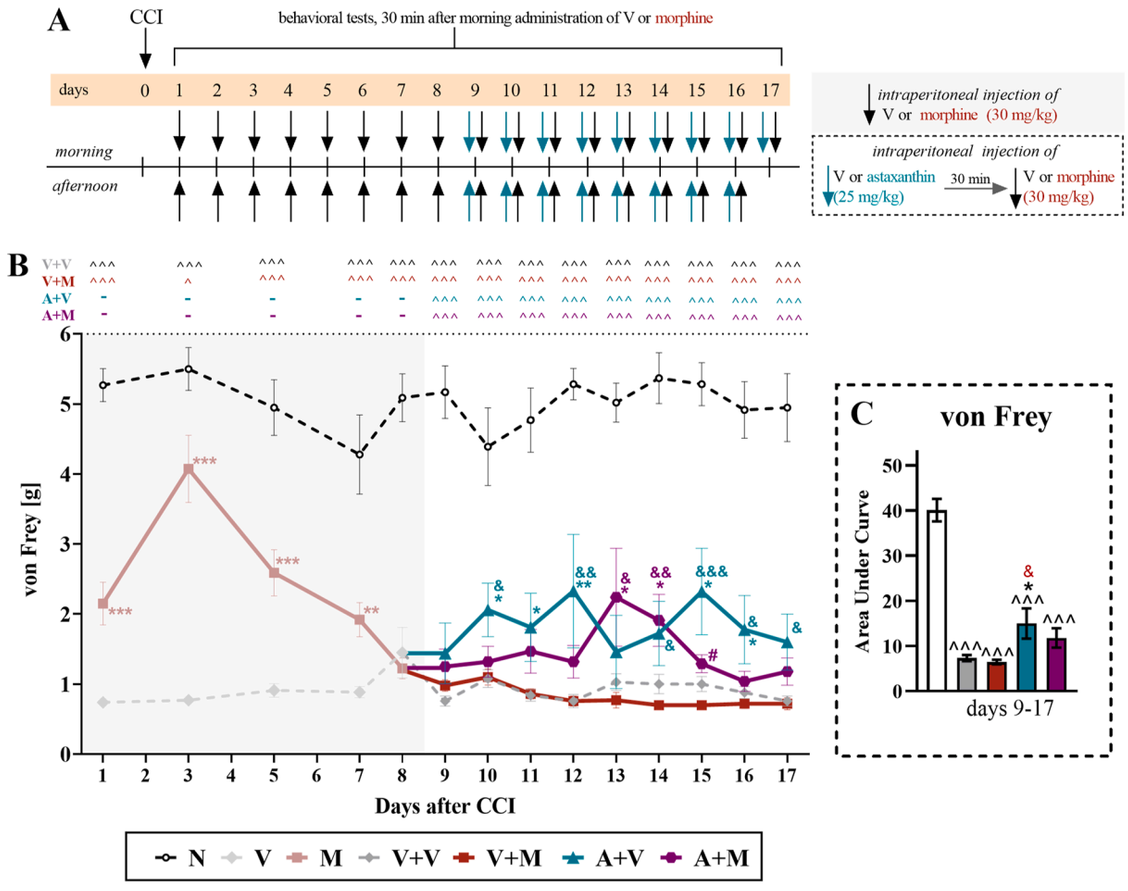


Fig. 2. The influence of the repeated twice daily administration of vehicle and astaxanthin (25 mg/kg, *i.p.*) that started when the repeated twice daily treatment with vehicle or morphine (30 mg/kg, i.p.) lost its efficacy on mechanical hypersensitivity in male mice with CCI. On the 1st day after CCI, vehicle or morphine was administered twice daily until Day 8, then the experimental groups were divided, and for the next 9 days, until Day 17, the mice received vehicle or astaxanthin twice daily 30 min before treatment with the vehicle or morphine (**A**). The von Frey tests (**B**) were conducted 30 min after the vehicle or morphine injection. The data are presented as the means ± SEMs, and the numbers of animals analyzed until Day 8 were as follows: N = 10; V = 20; and M = 20. The numbers of animals analyzed from Days 9–17 were as follows: N = 10; V + V = 10; V + M = 10; A + V = 9–10; and A + M = 10. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test. Additionally, the data obtained from the von Frey **(B)** test were analyzed as area under the curve **(C)** to visualize overall changes between treatments. ^p < 0.05 and ^^p < 0.001 indicate differences between naive and CCI-exposed mice; *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 indicate differences compared with V + V-treated CCI-exposed mice; &p < 0.05, &&p < 0.01 and &&&p < 0.001 indicate differences compared with the V + M-treated CCI-exposed mice; and #p < 0.05 indicates differences compared with the A + V-treated CCI-exposed mice. The dotted lines indicate the cutoff values for the test. Abbreviations: A, astaxanthin; M, morphine; N, naive; V, vehicle; CCI, chronic constriction injury.

primary antibodies: rabbit anti-cFos (1:1000, 2250; Cell Signaling, Danvers, USA), anti-Iba-1 (1:500, NBP2-19019; Novus, Abingdon, UK), anti-Gfap (1:10 000, NB300-141; Novus), anti-pp38 (1:1000, 4631; Cell Signaling), anti-pERK1/2 (1:1000, 4370; Cell Signaling), anti-pJNK (1:1000, 4671; Cell Signaling), anti-pNFκB (1:1000, sc-33039; Santa Cruz, Dallas, USA), anti-Sod1 (1:1000, 37 385; Cell Signaling), anti-Nrf2 (1:1000, 20 733; Cell Signaling), anti-NR2B (1:1000, 4212; Cell Signaling) and mouse anti-β-actin (1:1000; SAB1305554-40TST, Sigma). Afterward, the membranes were washed with TBST and incubated for 1 h at room temperature with HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (1:5000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluted in SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer Kit (Merck) buffer. Proteins were detected using Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) and visualized with a Fujifilm LAS-4000 FluorImager system. Fujifilm MULTI GAUGE software V3.0 (Tokyo, Japan) was used to estimate the intensities of the immunoreactive bands.

Data analysis

The behavioral data are presented as the means ± SEMs in grams or seconds. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the experimental results, followed by Bonferroni *post hoc* correction of selected pairs measured separately at each time point. The results shown in Figs. 1–5 and 10–11 were additionally evaluated using two-way repeated-measures ANOVA to detect time–drug interactions. Moreover, the area under the curve (AUC) was calculated for the behavioral data by trapezoidal and Simpson's rules, as described by Tallarida and Murray [76], and a *t*-test was used to compare the effects of the tested doses between the sexes (Fig. 1). For the dose dependency study, the Litchfield and Wilcoxon methods were applied to determine the antinociceptive dose necessary to produce a 50 % response (ED_{50}) and the 95 % confidence intervals of the quantitative data, which were automatically calculated with Pharm/PCS software (version 4) for the results

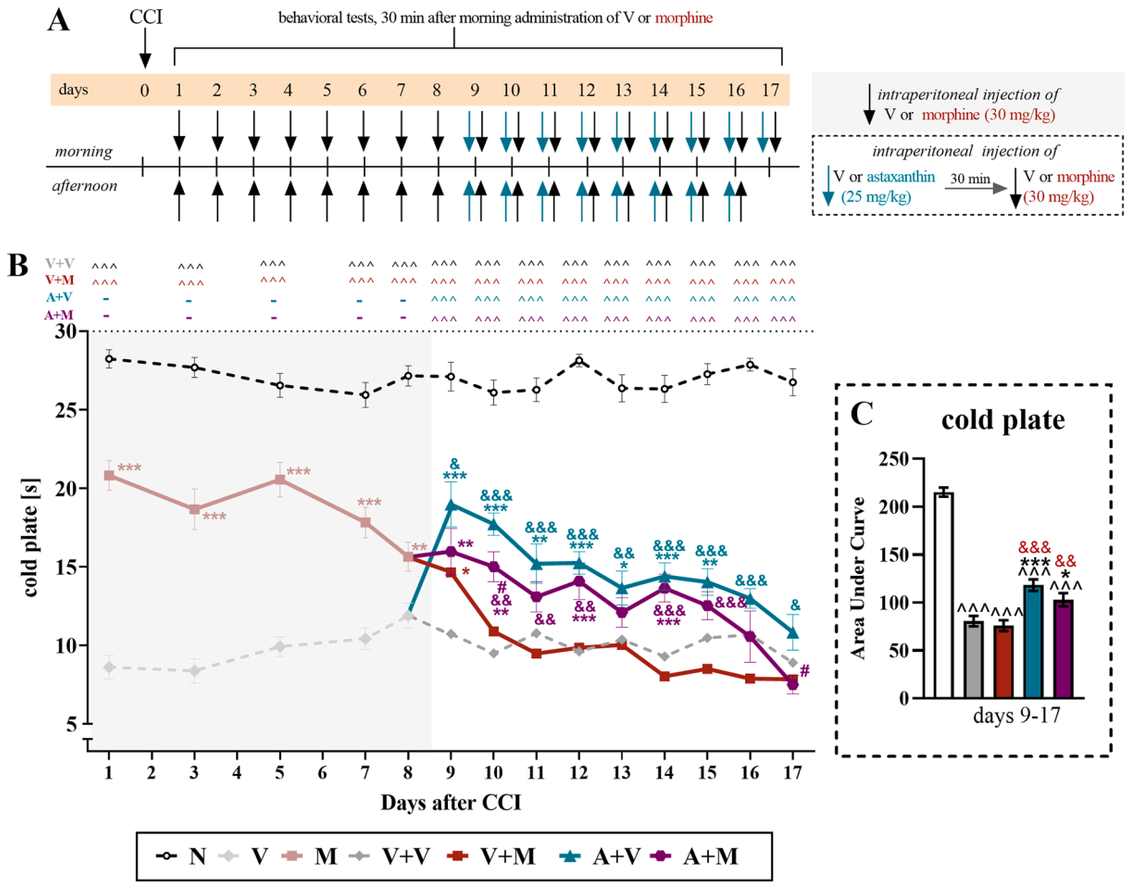


Fig. 3. The influence of the repeated twice daily administration of vehicle and astaxanthin (25 mg/kg, *i.p.*) that started when repeated twice daily treatment with vehicle or morphine (30 mg/kg, *i.p.*) lost its efficacy on thermal hypersensitivity in male mice with CCI. On the 1st day after CCI, vehicle or morphine was administered twice daily until Day 8, then the experimental groups were divided, and for the next 9 days, until Day 17, the mice received vehicle or astaxanthin twice daily 30 min before treatment with the vehicle or morphine (**A**). The cold plate tests (**B**) were conducted 30 min after the vehicle or morphine injections. The data are presented as the means ± SEMs, and the numbers of animals analyzed until Day 8 were as follows: N = 10; V = 20; and M = 20. The numbers of animals analyzed from Days 9–17 were as follows: N = 10; V + V = 10; V + M = 10; A + V = 9–10; and A + M = 10. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test. Additionally, the data obtained from the cold plate **(B)** test were analyzed as area under the curve **(C)** to visualize overall changes between treatments. ^^^p<0.001 indicates differences between naive and CCI-exposed mice; *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 indicate differences compared with V + V-treated CCI-exposed mice; &p < 0.05, &&p < 0.01, and &&&p < 0.001 indicate differences compared with the V + M-treated CCI-exposed mice; and #p < 0.05 indicates differences compared with the A + V-treated CCI-exposed mice. The dotted lines indicate the cutoff values for the test. Abbreviations: A, astaxanthin; M, morphine; N, naive; V, vehicle; CCI, chronic constriction injury.

obtained 1.5 h after drug administration. For biochemical analyses, the RT–qPCR and Western blotting results are presented as the fold changes relative to the control (naive) ± SEMs. The number of animals was chosen based on our previous research and is noted in the figure captions [66,77,78]. Similar to the behavioral studies, the data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* correction. All the statistical analyses and graphs were generated using Prism software (version 9.1.2 (226), GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Effects of a single intraperitoneal administration of astaxanthin on mechanical and thermal hypersensitivity in male and female mice on the 7th day after CCI

Single *i.p.* injections of astaxanthin at different doses (1, 10, 25 and 50 mg/kg) were performed in male and female mice on Day 7 after CCI (Fig. 1A), and the influence of the substance on hypersensitivity to mechanical (Fig. 1B–D) and thermal (Fig. 1C–E) stimuli was measured.

According to the von Frey test, astaxanthin reduced mechanical hypersensitivity in both sexes. In male mice, the most effective dose of this substance was 50 mg/kg, which had an analgesic effect on mechanical hypersensitivity at 0.5 h ($F_{4,27} = 12.74$; $p < 0.0001$), 1.5 h ($F_{4,27} = 11.95$; $p < 0.0001$), 3 h ($F_{4,27} = 8.86$; $p = 0.0001$) and 5 h ($F_{4,27} = 3.34$; $p = 0.0240$) after treatment (Fig. 1B). A dose of 25 mg/kg had an analgesic effect at the same time points, except 5 h, whereas the other dose of 10 mg/kg caused a decrease in mechanical hypersensitivity only at 0.5 h and 1.5 h after treatment. The analgesic effects of these doses were no longer observed 24 h after administration, and the lowest dose of 1 mg/kg had no effect at any of the tested time points (Fig. 1B). Two-way repeated-measures ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the tested time points ($F_{20,162} = 5.35$; $p < 0.0001$, Fig. 1B). In female mice, the highest dose of astaxanthin (50 mg/kg) also reduced mechanical hypersensitivity, with the most pronounced effect observed 1.5 h ($F_{4,35} = 5.57$; $p = 0.0014$) after

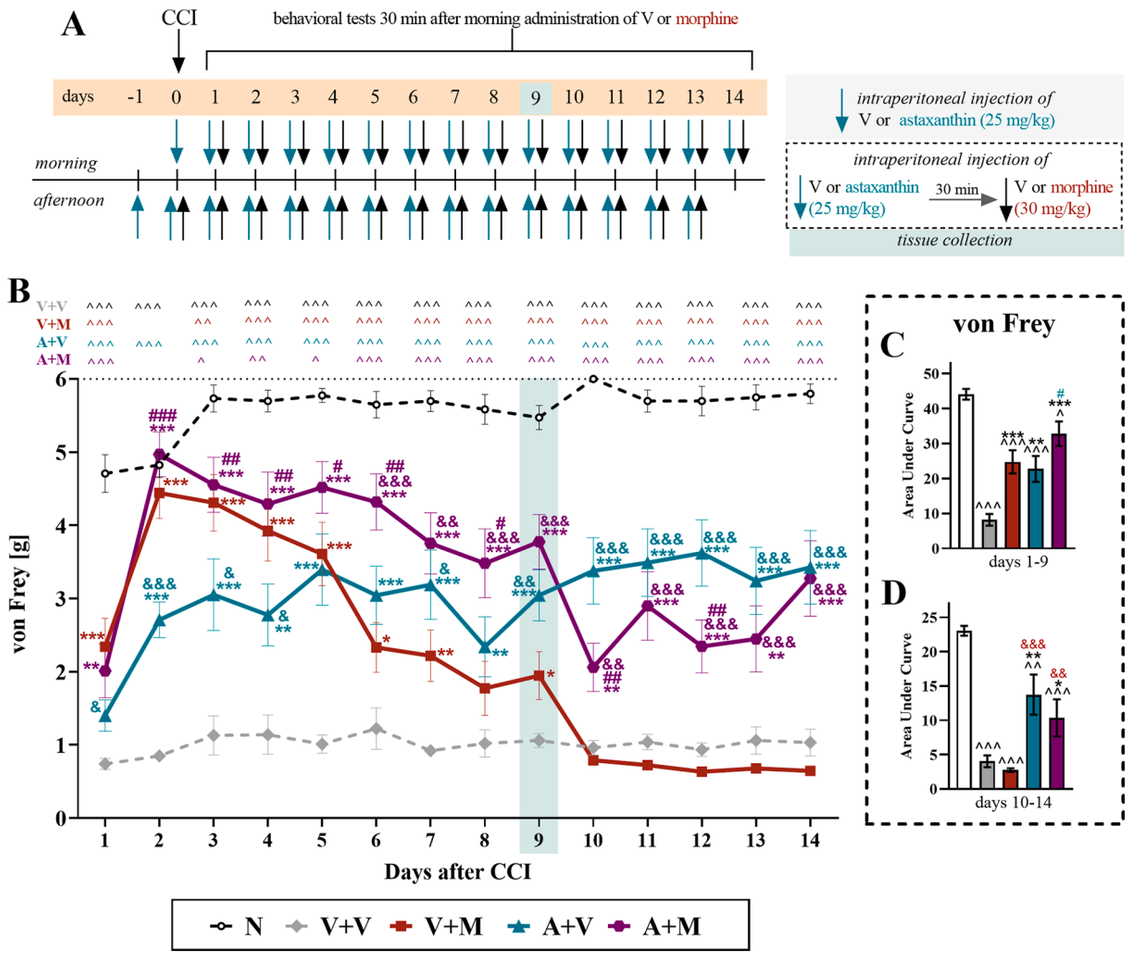


Fig. 4. The influence of repeated twice daily intraperitoneal injections of the vehicle, morphine (30 mg/kg *i.p.*), astaxanthin (25 mg/kg *i.p.*) or the combination of astaxanthin and morphine on mechanical hypersensitivity in male mice with CCI. The vehicle and astaxanthin were repeatedly administered 16 and 1 h before CCI and then twice daily for 14 days 30 min before treatment with the vehicle or morphine **(A)**. The von Frey tests (**B**) were conducted 30 min after the vehicle or morphine injection. The data are presented as the means ± SEMs, and the numbers of animals were as follows: N = 10–20; V + V = 19–20; V + M = 18–20; A + V = 19–20; and A + M = 19–20. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test. Additionally, the data obtained from the von Frey **(B)** test were analyzed as areas under the curves **(C, D)** to visualize overall changes between treatments at two time intervals. ^p <0.05, ^^p <0.01, and ^^^p<0.001 indicate differences between naive and CCI mice; *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 indicate differences compared with V + V-treated CCI mice; &p < 0.05, &&p < 0.01, and &&&p < 0.001 indicate differences compared with the V + M-treated CCI mice; and #p < 0.05, ##p < 0.01, and ###p < 0.001 indicate differences compared with the A + V-treated CCI mice. The dotted lines indicate the cutoff values for the tests, and the blue rectangles represent the time points of tissue collection. Abbreviations: A, astaxanthin; M, morphine; N, naive; V, vehicle; CCI, chronic constriction injury.

administration (Fig. 1D). The dose of 25 mg/kg reduced mechanical hypersensitivity at all assessed time points, except 24 h, with the greatest effect seen at 3 h ($F_{4,35} = 4.63$; $p = 0.0134$) and 5 h ($F_{4,35} = 5.77$; $p = 0.0134$) after administration. The other doses did not cause a decrease in mechanical hypersensitivity at any time point after treatment, except for the dose of 10 mg/kg at 5 h after administration. Two-way repeated-measures ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the tested time points ($F_{20,210} = 2.78$; $p = 0.0001$, Fig. 1D). Moreover, the analysis of the AUC revealed that the same dose of *i.p.* administered astaxanthin had a similar effect on hypersensitivity to mechanical stimuli in both male and female mice subjected to CCI (Fig. 1F).

According to the cold plate test results, astaxanthin also reduced thermal hypersensitivity in both sexes. In males, the best analgesic effects were observed for a dose of 50 mg/kg at 5 h ($F_{4,27} = 14.49$; $p < 0.0001$); however, this dose was also effective at other time points tested, except 24 h after administration (Fig. 1C). Similarly, the dose of 25 mg/kg also effectively reduced thermal hypersensitivity, with the most pronounced effect observed 3 h ($F_{4,27} = 19.99$; $p < 0.0001$) after administration. The 10 mg/kg dose had a slightly weaker effect; however, it also diminished thermal hypersensitivity at each time point except 24 h, whereas the 1 mg/kg dose reduced thermal hypersensitivity only at 0.5 h ($F_{4,27} = 8.54$; $p = 0.0001$) after treatment. Two-way repeated-measures ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the tested time points ($F_{20,162} = 3.53$; $p < 0.0001$, Fig. 1C). In female mice, the highest doses of astaxanthin (25 and 50 mg/kg) were similarly effective and significantly reduced thermal hypersensitivity at all assessed time points, except at 24 h post-administration. The most pronounced effects were observed between 1.5 h ($F_{4,35} = 16.85$; $p < 0.0001$) and 5 h ($F_{4,35} = 12.77$; $p < 0.0001$) after administration (Fig. 1E). The 10 mg/kg dose produced the strongest analgesic effect at 3 h ($F_{4,35} = 14.26$; $p < 0.0001$) post-administration, while the 1 mg/kg dose did not elicit any significant effect. Two-way repeated-measures ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the tested time points ($F_{20,210} = 4.62$; $p < 0.0001$, Fig. 1E). Moreover, an analysis of the

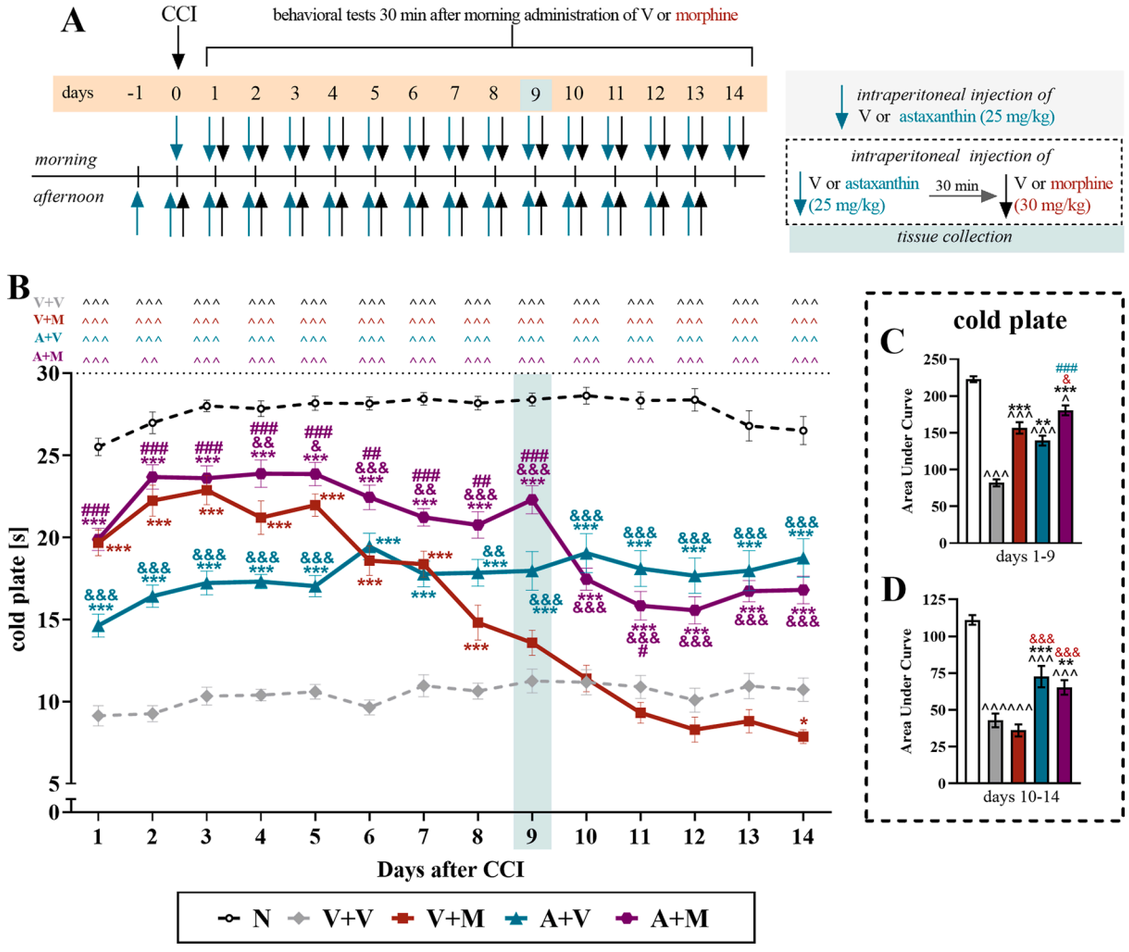


Fig. 5. The influence of repeated twice daily intraperitoneal injections of the vehicle, morphine (30 mg/kg *i.p.*), astaxanthin (25 mg/kg *i.p.*) or the combination of astaxanthin and morphine on thermal hypersensitivity in male mice with CCI. The vehicle and astaxanthin were repeatedly administered 16 and 1 h before CCI and then twice daily for 14 days 30 min before treatment with the vehicle or morphine **(A)**. The cold plate tests (**B**) were conducted 30 min after vehicle or morphine injection. The data are presented as the means ± SEMs, and the numbers of animals were as follows: N = 10–20; V + V = 19–20; V + M = 18–20; A + V = 19–20; and A + M = 19–20. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test. Additionally, the data obtained from the cold plate **(B)** test were analyzed as areas under the curves **(C, D)** to visualize overall changes between treatments at two time intervals. ^p<0.05, ^^p<0.01 and ^^^p<0.001 indicate differences between naive and CCI-exposed mice; *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 indicate differences compared with V + V-treated CCI-exposed mice; &p < 0.05, &&p < 0.01, and &&&p < 0.001 indicate differences compared with the V + M-treated CCI-exposed mice; and #p < 0.05, ##p < 0.01, and ###p < 0.001 indicate differences compared with the A + V-treated CCI-exposed mice. The dotted lines indicate the cutoff values for the test, and the blue rectangles represent the time points of tissue collection. Abbreviations: A, astaxanthin; M, morphine; N, naive; V, vehicle; CCI, chronic constriction injury.

AUC revealed that after *i.p.* administration, astaxanthin had a similar effect on hypersensitivity to thermal stimuli in both male and female mice with neuropathic pain (Fig. 1G).

As specified by the calculated ED_{50} for *i.p.* administration, the values obtained from the von Frey test were the same for both sexes. In the cold plate test, a lower ED_{50} value was calculated (Table 1), but these differences were not statistically significant compared with those for females. Due to the slightly better effect of astaxanthin administered at a dose of 50 mg/kg on males, experiments with repeated administration of this substance were performed to obtain a daily dose of 50 mg/kg, which was achieved by two injections of 25 mg/kg astaxanthin.

Effects of repeated intraperitoneal injections of astaxanthin on the mechanical and thermal hypersensitivity of CCI-exposed male mice that developed morphine tolerance

An investigation of the effect of astaxanthin on mechanical hypersensitivity in animals that had developed tolerance to morphine was performed in male mice subjected to CCI (Fig. 2A), in accordance with the regimen provided in Materials and methods. The results indicated that vehicle-treated mice subjected to CCI exhibited persistent mechanical hypersensitivity throughout the 17-day experimental period. In the von Frey test, 30 mg/kg morphine administered from Day 1 after CCI lost its effectiveness in reducing hypersensitivity to mechanical stimuli on Day 8 ($F_{2,47} = 38.84$; $p < 0.0001$) (Fig. 2B). The administration of astaxanthin at the time of the loss of the analgesic effect of morphine

Table 1
The ED_{50} values for the effects of *i.p.* (1, 10, or 50 mg/kg) astaxanthin administered to male and female mice were calculated, along with 95 % confidence intervals for CCI-exposed mice, as measured by von Frey and cold plate tests 1.5 h after the drug injection.

ASTAXANTHIN		
BEHAVIORAL TESTS	ED_{50}	
	♂	♀
von Frey	130.62 (4.13–4129.05)	130.62 (4.13–4129.05)
cold plate	3.34 (0.36–30.68)	12.50 (1.18–132.58)

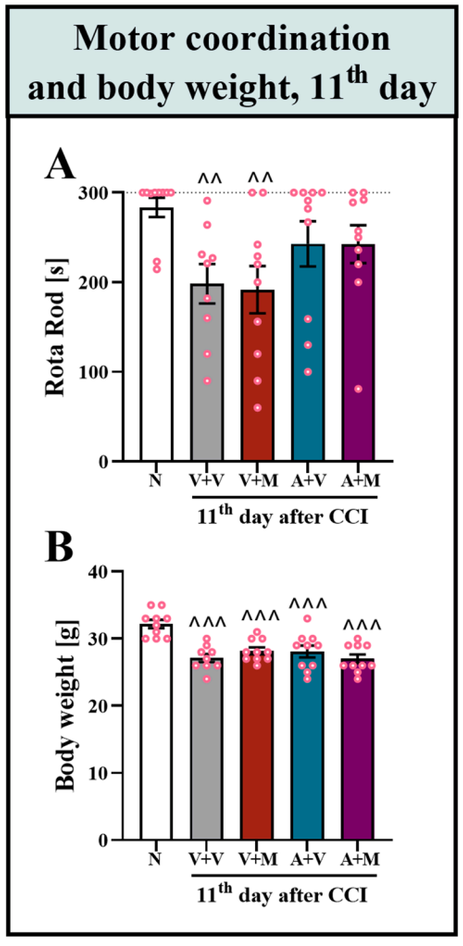


Fig. 6. Effects of the repeated *i.p.* administration of the vehicle, astaxanthin (25 mg/kg) or morphine (30 mg/kg) alone or the combination of astaxanthin with morphine on the motor coordination and body weight of male mice with CCI. This evaluation was performed on Day 11 as part of the repeated administration study. The rotarod test was conducted 1 h after morphine administration (**A**), and body weight (**B**) measurements were also performed. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test. ^^p<0.01 and ^^^p<0.001 indicate differences between naive and CCI-exposed mice. The dotted line indicate the cutoff values for the rotarod test. Abbreviations: A, astaxanthin; M, morphine; N, naive; V, vehicle.

improved the effect of morphine on Days 13 ($F_{4,45} = 17.11$; $p < 0.0001$) and 14 ($F_{4,44} = 37.15$; $p < 0.0001$) after CCI. In the animals that received astaxanthin alone, a slight analgesic effect was observed until the last day of the experiment. Additionally, the analysis of the AUC of the von Frey test (Fig. 2C) revealed that only astaxanthin administered alone had a beneficial effect on mechanical hypersensitivity in CCI animals ($F_{4,20} = 42.40$; $p < 0.0001$).

An investigation of the effect of astaxanthin on thermal hypersensitivity in animals that had developed tolerance to morphine was performed in male mice subjected to CCI (Fig. 3A), in accordance with the regimen described in Materials and methods. The results indicated that vehicle-treated mice subjected to CCI exhibited persistent thermal hypersensitivity throughout the 17-day experimental period. In the cold plate test, 30 mg/kg morphine administered from Day 1 after CCI lost its effectiveness in reducing hypersensitivity to thermal stimuli on Day 10 ($F_{4,45} = 52.05$; $p < 0.0001$) (Fig. 3B). Compared with morphine alone, the administration of astaxanthin at the time of weaker morphine analgesic action significantly improved the reduction in thermal hypersensitivity until Day 17 ($F_{4,44} = 110.30$; $p < 0.0001$); however, during the last 2 days of the experiments, both groups exhibited similar responses in the cold plate test. Moreover, the animals that received astaxanthin alone presented the greatest reduction in thermal hypersensitivity, and this effect persisted throughout the experiment. Additionally, the analysis of the AUC of the cold plate test (Fig. 3C) indicated that astaxanthin administered alone and astaxanthin administered with morphine had beneficial effects on thermal hypersensitivity in CCI-exposed animals ($F_{4,20} = 97.41$; $p < 0.0001$).

Effects of repeated intraperitoneal injections of astaxanthin with morphine on the mechanical and thermal hypersensitivity of CCI-exposed male mice

An investigation of the influence of astaxanthin on the development of morphine tolerance to mechanical hypersensitivity was performed in male mice subjected to CCI (Fig. 4A), in accordance with the regimen provided in Materials and methods. The results of the von Frey test indicated that vehicle-treated CCI mice exhibited mechanical hypersensitivity until the last, 14th day of the experiment. Morphine was administered at a dose of 30 mg/kg starting on Day 0, the day of CCI, and a progressive decline in its analgesic efficacy was observed, with no effect detected on Day 10 ($F_{4,83} = 39.22$; $p < 0.0001$) (Fig. 4B). Pretreatment with astaxanthin followed by the 14-day administration of this substance (twice daily, 25 mg/kg *i.p.*) with morphine (twice daily, 30 mg/kg, *i.p.*) significantly improved the analgesic effects of this opioid, as observed in the von Frey test starting from the 6th day after CCI ($F_{4,93} = 27.61$; $p < 0.0001$). Additionally, the injection of astaxanthin alone attenuated the development of mechanical hypersensitivity in mice from the second day following CCI until the last day of the experiment. Moreover, the analysis of the AUC of the von Frey test (Fig. 4C and D), which was calculated for two selected intervals (Days 1–9 and 10–14), indicated that morphine significantly lost its effectiveness over time, whereas animals receiving astaxanthin alone or astaxanthin with morphine continued to display significantly reduced hypersensitivity to mechanical stimuli compared with the vehicle-treated mice ($F_{4,20} = 19.69$; $p < 0.0001$).

An investigation of the influence of astaxanthin on the development of morphine tolerance to thermal hypersensitivity was performed in male mice subjected to CCI (Fig. 5A), in accordance with the regimen provided in Materials and methods. The results of the cold plate test indicated that vehicle-treated CCI mice exhibited thermal hypersensitivity until the last, 14th day of the experiment. Morphine was administered at a dose of 30 mg/kg starting on Day 0, the day of CCI, and a progressive decline in its analgesic efficacy was observed, with no effect on thermal hypersensitivity detected on Day 9 ($F_{4,94} = 69.60$; $p < 0.0001$) (Fig. 5B). Pretreatment with astaxanthin followed by the 14-day administration of this substance (twice daily, 25 mg/kg *i.p.*) with morphine (twice daily, 30 mg/kg, *i.p.*) significantly improved the analgesic effects of this opioid, as observed in the cold plate test until Day 14 ($F_{4,80} = 58.44$; $p < 0.0001$). Additionally, the injection of astaxanthin alone attenuated the development of thermal hypersensitivity in mice following CCI until the last day of the experiment. Moreover, the analysis of the AUC of the cold plate test (Fig. 5C and D), which was calculated for two selected intervals (Days 1–9 and 10–14), indicated that morphine significantly lost its effectiveness over time, whereas animals receiving astaxanthin alone or astaxanthin with morphine continued to have significantly reduced hypersensitivity to thermal stimuli compared with the vehicle-treated mice ($F_{4,20} = 34.95$; $p < 0.0001$).

Influence of repeated intraperitoneal injections of astaxanthin and morphine on the motor coordination and body weight of male mice with CCI

The effects of astaxanthin and morphine on motor coordination in CCI mice were evaluated on Day 11 as a part of the repeated

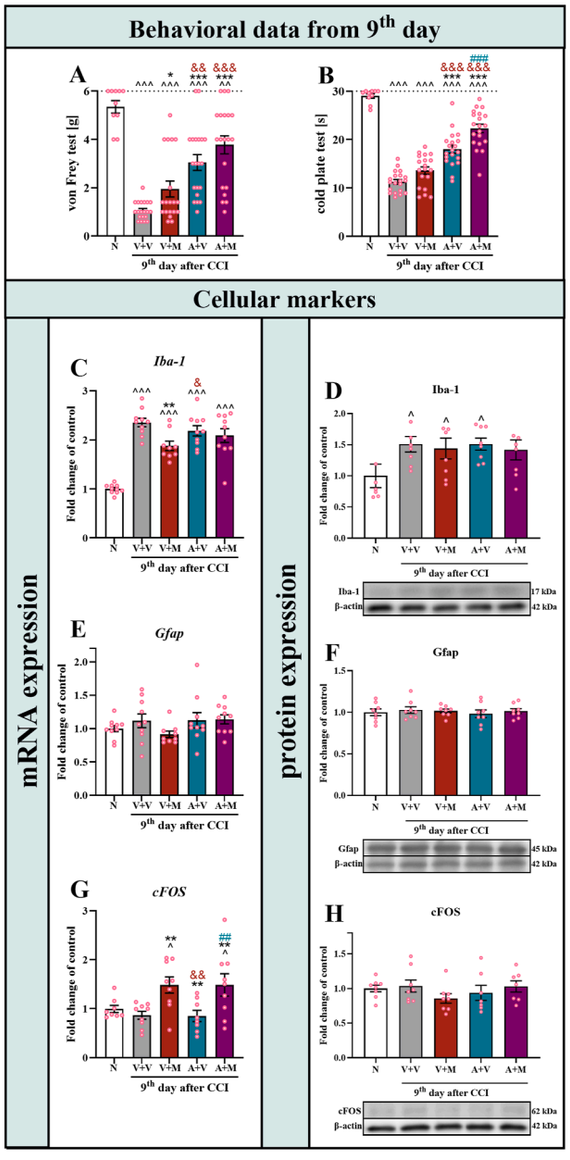


Fig. 7. Analysis of the response of individual animals on Day 9 post-CCI after two daily intraperitoneal injections of the vehicle, morphine (30 mg/kg *i.p.*), astaxanthin (25 mg/kg *i.p.*) or the combination of astaxanthin with morphine, as measured by von Frey (A) and cold plate (B) tests. Moreover, the pharmacological effects on the mRNA levels of *Iba-1* (**C**), *Gfap* (**E**) and *cFos* (**G**) were measured *via* RT–qPCR, and on the protein levels of Iba-1 (**D**), Gfap (**F**) and cFos (**H**) were assessed *via* Western blotting in the spinal cords of CCI-exposed mice on the day 9th and also in naive. The behavioral data are presented as the means ± SEMs (n = 10–20). The biochemical data are presented as the fold changes relative to the control ± SEMs (n = 6–10). The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test. Differences between groups are presented as follows: ^p<0.05, ^^p^0.01 and ^^^p<0.001 indicate differences compared with the naive mice; *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 indicate differences compared with the V + V-treated CCI-exposed mice; &p < 0.05, &&p < 0.01, and &&& p < 0.001 indicate differences compared with the V + M-treated CCI-exposed mice; ##p < 0.01 and ###p < 0.001 indicate differences compared with the A + V-treated CCI-exposed mice. The dotted lines indicate the cutoff values for the behavioral tests. Abbreviations: A, astaxanthin; M, morphine; N, naive; V, vehicle; CCI, chronic constriction injury.

administration study. At this time point, the analgesic effects of astaxanthin were observed; however, the effectiveness of morphine had already decreased (Figs. 4B and 5B). Importantly, the results revealed that mice subjected to CCI and receiving vehicle or morphine performed worse on the rotating rod than did the naive group ($F_{4,44} = 2.96$; $p = 0.0298$); however, in the groups that received astaxanthin, no such effect was observed (Fig. 6A). Additionally, body weight measurements taken on the same day revealed a difference between the naive and CCI-exposed groups, as mice subjected to nerve injury showed a slight reduction in body weight ($F_{4,44} = 10.32$; $p < 0.0001$) (Fig. 6B).

Changes in the mRNA and protein levels of Iba-1, Gfap and cFos in the spinal cord of male mice after repeated, twice-daily morphine or astaxanthin treatment on Day 9 after CCI

On the 9th day after CCI, mechanical and thermal hypersensitivity developed (Fig. 7A and B), as observed in the vehicle-treated group compared with the naive group. Moreover, the analgesic effect of twice-daily repeated morphine administration was diminished in the von Frey test and was no longer detectable in the cold plate test (Fig. 7 A, B). However, the repeated twice daily administration of astaxanthin had good analgesic effects on the results of both the von Frey ($F_{4,84} = 24.13$; $p < 0.0001$) (Fig. 7A) and cold plate ($F_{4,84} = 71.52$; $p < 0.0001$) (Fig. 7B) tests. Similarly, twice daily injections of astaxanthin with morphine diminished mechanical and thermal hypersensitivity, as observed in both behavioral tests.

On this day of the experiment, changes in the expression of markers of cells involved in nociception were also examined. The results indicate that CCI evokes a significant increase in the expression of the microglia/macrophage marker *Iba-1* mRNA in the spinal cord of the mice, regardless of the treatment ($F_{4,44} = 30.02$; $p < 0.0001$) (Fig. 7C). Similarly, at the protein level, nerve injury induced an increase in Iba-1 expression in the spinal cord in all the groups of animals studied, except for the mice that received both morphine and astaxanthin ($F_{4,34} = 1.89$; $p = 0.1335$) (Fig. 7D). No changes in the expression of the astrocyte marker Gfap were observed at either the mRNA ($F_{4,44} = 1.37$; $p = 0.2605$) (Fig. 7E) or protein ($F_{4,35} = 0.22$; $p = 0.9228$) (Fig. 7F) level in any of the studied groups. The expression level of neuronal marker, *cFos*, mRNA in the spinal cord was elevated only in mice treated with morphine or the combination of morphine and astaxanthin, whereas it was lower in mice treated with astaxanthin alone, compared to these two groups ($F_{4,38} = 4.79$; $p = 0.0031$) (Fig. 7G), but similar changes were not observed at the protein level of cFos (Fig. 7H).

Changes in the protein levels of pp38, pERK1/2, pJNK and pNFκB in the spinal cord of male mice after repeated, twice-daily morphine or astaxanthin treatment on Day 9 after CCI

Western blot analysis of MAPK signaling proteins and the transcription factor NFκB was performed to verify whether these proteins are involved in the analgesic effects of astaxanthin. These factors are of particular interest in neuropathic pain, as both MAPK signaling pathways and NFκB are key regulators of neuroinflammation, glial cell activation, and neuronal sensitization, processes that critically contribute to the initiation and maintenance of neuropathic pain states. However, on Day 9 after CCI, no changes in the spinal cord levels of the pp38 ($F_{4,35} = 0.86$; $p = 0.4950$) (Fig. 8A), pERK1/2 ($F_{4,26} = 0.30$; $p = 0.8702$) (Fig. 8B), pJNK ($F_{4,35} = 0.94$; $p = 0.4509$) (Fig. 8C) and pNFκB ($F_{4,35} = 0.88$; $p = 0.4880$) (Fig. 8D) proteins were observed regardless of the treatment.

Changes in the mRNA and protein levels of Sod1, Nrf2 and NR2B in the spinal cord of male mice after repeated, twice-daily morphine or astaxanthin treatment on Day 9 after CCI

To determine whether the mechanisms of action previously proposed for astaxanthin underlie its analgesic effects in neuropathic pain,

changes in mRNA and protein expression levels were analyzed. Specifically, the expression of Sod1, the transcription factor Nrf2, and the NR2B subunit of the NMDA receptor was examined, as these molecules are closely related to both the proposed mechanisms of astaxanthin action and key pathways involved in neuropathic pain. Sod1 is a component of the endogenous antioxidant defense system, and its dysfunction is associated with neuronal damage and, as a consequence, the development of hypersensitivity. On Day 9 after CCI, changes in *Sod1* mRNA expression were observed in the mice after treatment with morphine alone, astaxanthin alone or in combination with astaxanthin comparing to naive animals ($F_{4,39} = 8.96$; $p < 0.0001$) (Fig. 9A). Furthermore, *Sod1* expression was reduced in animals treated with morphine alone or in combination with astaxanthin, compared to the vehicle-treated group. No changes in Sod1 protein (Fig. 9B) expression were observed in any of the animals, regardless of the treatment ($F_{4,35} = 0.94$; $p = 0.4522$).

Nrf2 is a key regulator of the cellular antioxidant response, and its activation mitigates oxidative stress and neuroinflammation, both of which contribute to neuronal hyperexcitability and the development of neuropathic pain. In the case of *Nrf2*, no changes in its mRNA level were observed ($F_{4,44} = 0.79$; $p = 0.5391$) (Fig. 9C). Importantly, in terms of protein expression, morphine administered alone led to a decrease in Nrf2 levels comparing to naive animals ($F_{4,25} = 2.84$; $p = 0.0454$) (Fig. 9D); in contrast, the administration of astaxanthin alone and in combination with morphine caused higher Nrf2 levels compared with those in the group of mice receiving morphine alone.

Excitatory glutamatergic signaling promotes central sensitization by enhancing neuronal responsiveness to nociceptive input, mainly through activation of the spinal NR2B subunit of NMDA receptors. The expression of its mRNA, *Grin2b*, decreased after CCI in the groups of animals receiving vehicle, astaxanthin alone or in combination with morphine compared with that in naive mice ($F_{4,44} = 11.37$; $p < 0.0001$) (Fig. 9E). Moreover, *Grin2b* mRNA expression decreased even more in the group of mice receiving astaxanthin compared to the group receiving the vehicle. In the case of the combined administration of astaxanthin and morphine, the mRNA expression of the *Grin2b* subunit was higher than that in the mice receiving astaxanthin alone but lower than that in the mice receiving morphine alone. Western blot analysis revealed that NR2B protein expression decreased in all animals after CCI, but the greatest decrease was observed in the mice that received astaxanthin alone and those that received astaxanthin in combination with morphine ($F_{4,35} = 38.67$; $p < 0.0001$) (Fig. 9F).

Effects of a single intrathecal injection of astaxanthin preceded by an injection of the Nrf2 inhibitor trigonelline in CCI mice

The Nrf2 inhibitor trigonelline (5 μg/5 μl) was administered 30 min before astaxanthin (2 μg/5 μl) on Day 7 after CCI to evaluate whether activation of the Nrf2 signaling pathway is involved in the antinociceptive effects of astaxanthin (Fig. 10A). The von Frey test results indicated that trigonelline administration did not affect mechanical hypersensitivity in mice with CCI at any time point examined (Fig. 10B). Astaxanthin administration led to a reduction in hypersensitivity at all examined time points, except at 0.5 and 24 h post-administration. Importantly, the administration of trigonelline before astaxanthin partially blocked the effectiveness of astaxanthin in reducing

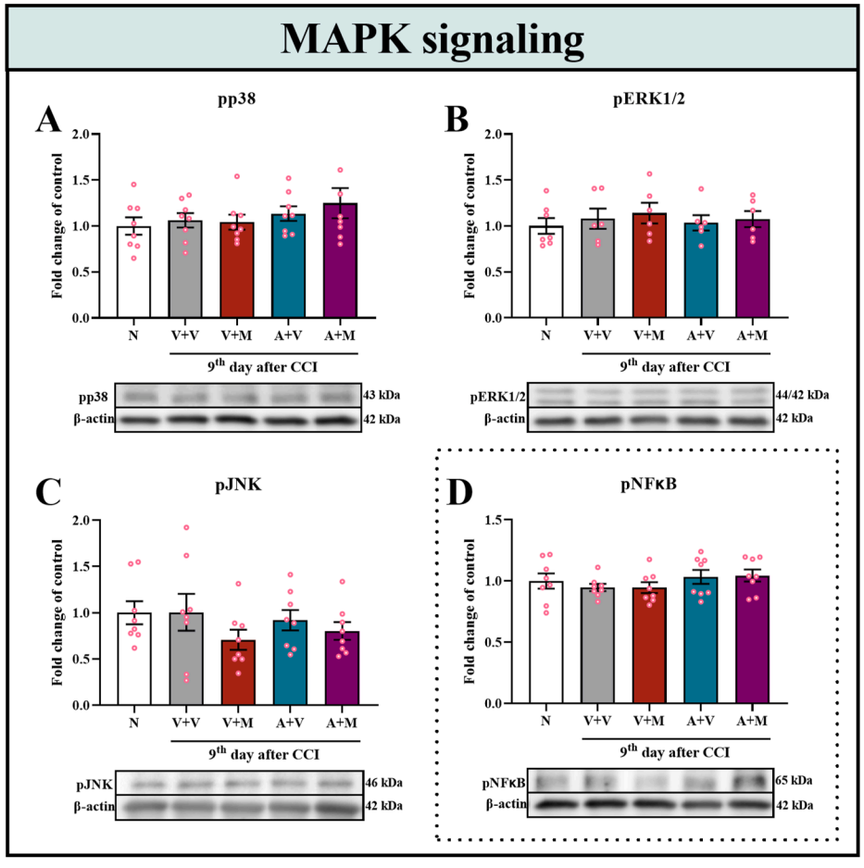


Fig. 8. The pharmacological influence of repeated daily intraperitoneal injections of the vehicle, morphine (30 mg/kg *i.p.*), and astaxanthin (25 mg/kg *i.p.*) alone and the combination of astaxanthin with morphine on the protein levels of pp38 (A), pERK1/2 (B), pJNK (C) and pNFκB (D) in the spinal cords of CCI-exposed mice on Day 9 and also in naive, as measured by Western blotting. The data are presented as the fold changes relative to the control ± SEMs (n = 6–8). The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test. Abbreviations: A, astaxanthin; M, morphine; N, naive; V, vehicle; CCI, chronic constriction injury.

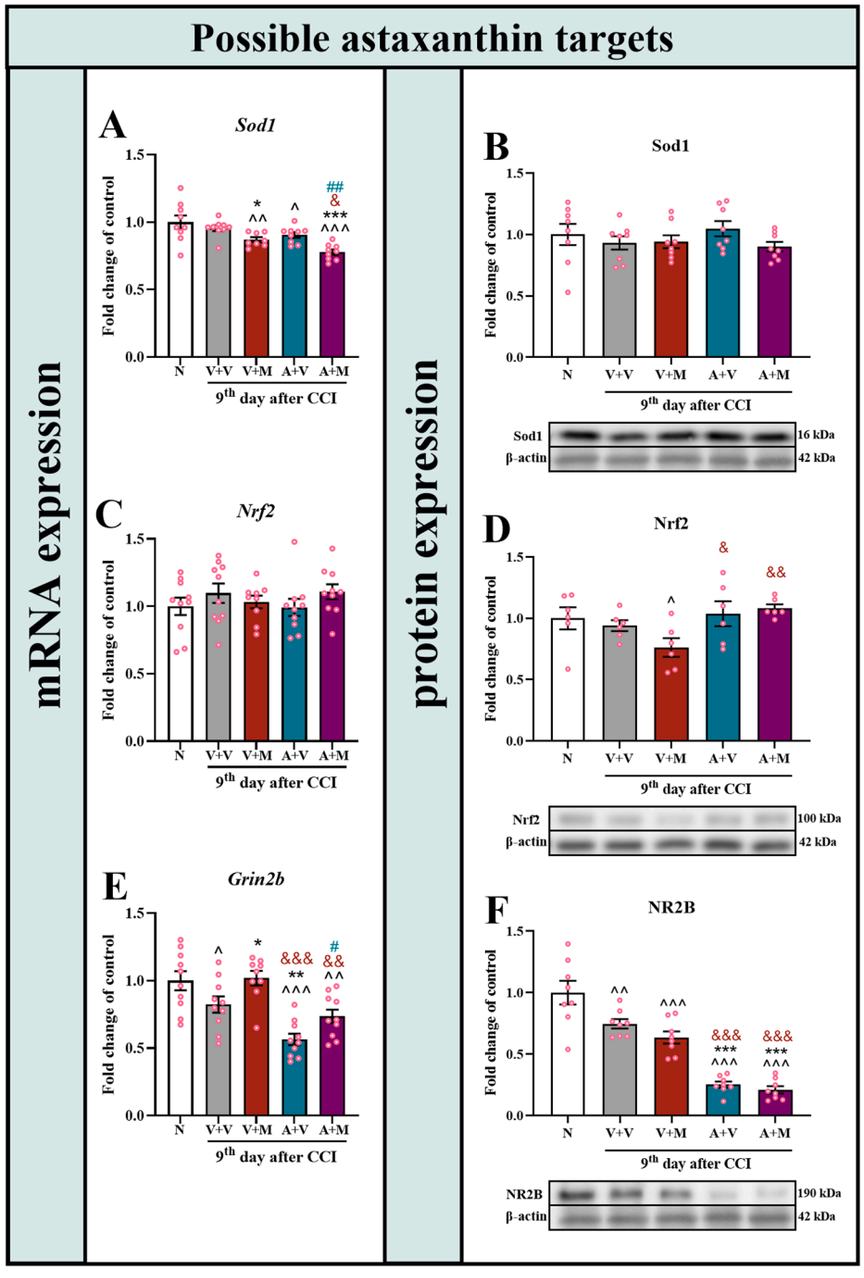


Fig. 9. The pharmacological effects of repeated twice daily intraperitoneal injections of the vehicle, morphine (30 mg/kg *i.p.*), astaxanthin (25 mg/kg *i.p.*), and the combination of astaxanthin with morphine on the mRNA levels of *Sod1* (A), *Nrf2* (C) and *Grin2b* (E) were measured *via* RT–qPCR, and on the protein levels of Sod1 (B), Nrf2 (D) and NR2B (F) were assessed *via* Western blotting on Day 9 in the spinal cords of CCI-exposed mice and also in naive. The data are presented as the fold changes relative to the control ± SEMs (n = 6–10). The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test. Differences between groups are presented as follows: ^p <0.05, ^^p<0.01 and ^^^p<0.001 indicate differences compared with the naive mice; *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 indicate differences compared with V + V-treated CCI-exposed mice; &p < 0.05, &&p < 0.01 and &&& p < 0.001 indicate differences compared with V + M-treated CCI-exposed mice; #p < 0.05 and ##p < 0.01 indicate differences compared with A + V-treated CCI-exposed mice. Abbreviations: A, astaxanthin; M, morphine; N, naive; V, vehicle; CCI, chronic constriction injury.

hypersensitivity to mechanical stimuli, as shown by the results of the von Frey test at 1.5 h ($F_{4,44} = 13.47$; $p < 0.0001$) and 5 h ($F_{4,44} = 13.45$; $p < 0.0001$) after injections. Two-way repeated-measures ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the tested time points ($F_{20,268} = 2.01$; $p = 0.0071$, Fig. 10B).

Trigonelline administration also did not affect hypersensitivity to thermal stimuli, as indicated by the cold plate test results (Fig. 10D), unlike astaxanthin, which evoked analgesic effects at all of the time points examined, except 24 h. The administration of trigonelline before astaxanthin blocked the effectiveness of astaxanthin in reducing hypersensitivity to thermal stimuli, as shown at 1.5 h ($F_{4,44} = 74.15$; $p < 0.0001$), 3 h ($F_{4,45} = 67.84$; $p < 0.0001$), 5 h ($F_{4,44} = 58.06$; $p < 0.0001$) and 24 h ($F_{4,45} = 90.10$; $p < 0.0001$) after administration. Two-way repeated-measures ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the tested time points ($F_{20,270} = 1.81$; $p = 0.0193$, Fig. 10D).

Analysis of AUC values for the von Frey test indicated that trigonelline did not affect the efficacy of astaxanthin (Fig. 10C), however AUC analysis for the cold plate test showed that trigonelline attenuated the analgesic effects of astaxanthin ($F_{4,15} = 64.74$; $p < 0.0001$) (Fig. 10E).

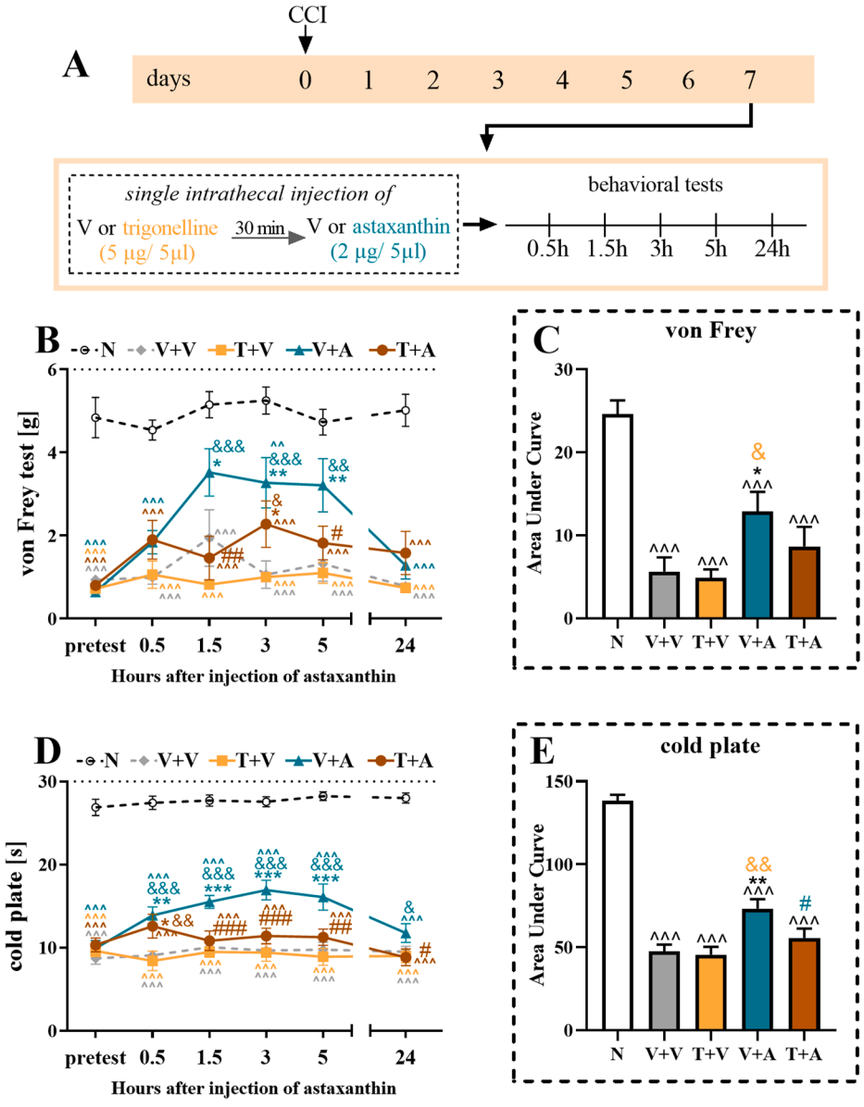


Fig. 10. The influence of a single intrathecal injection of vehicle and astaxanthin (2 µg/5 µl) preceded by the administration of vehicle or trigonelline (5 µg/5 µl) to male mice on Day 7 after CCI, as assessed at 0.5, 1.5, 3, 5 and 24 h after treatment (A), on mechanical and thermal hypersensitivity measured using von Frey (B) and cold plate (D) tests, respectively. Additionally, the results obtained from the behavioral tests were analyzed as areas under the curves **(C, E)** to visualize overall changes in treatment efficacy. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test. ^^p<0.01, and ^^^p<0.001 indicate differences compared with naive mice; *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 indicate differences compared with V + V-treated CCI-exposed mice; &p < 0.05, &&p < 0.01, and &&&p < 0.001 indicate differences compared with the T + V-treated CCI-exposed mice; #p < 0.05, ##p < 0.01, and ###p < 0.001 indicate differences compared with the V + A-treated CCI-exposed mice. The dotted lines indicate the cutoff values for the behavioral tests. Abbreviations: A, astaxanthin; N, naive; V, vehicle; CCI, chronic constriction injury; T, trigonelline.

Effects of a single intrathecal injection of quinolinic acid preceded by an astaxanthin injection in naive mice

The NMDA receptor agonist quinolinic acid (10 µg/5 µl) was administered to naive mice 30 min after astaxanthin (2 µg/5 µl) to evaluate whether NMDA signaling is involved in the antinociceptive effects of astaxanthin (Fig. 11A). As indicated by the von Frey test results, the administration of quinolinic acid alone induced long-lasting hypersensitivity to mechanical stimuli, as observed at all the examined time points, with the most pronounced effect observed 3h ($F_{4,44}$ = 9.36; p < 0.0001) after injection, whereas the injection of astaxanthin alone did not affect the sensitivity of naive mice (Fig. 11B). Importantly, the administration of astaxanthin prior to the quinolinic acid injection partially blocked the occurrence of hypersensitivity to mechanical stimuli, as shown by the test results between 1.5 h ($F_{4,44}$ = 2.60; p = 0.0488), and 5 h ($F_{4,44}$ = 3.66; p = 0.0116) after treatment. Two-way repeated-measures ANOVA did not confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the tested time points ($F_{28,353}$ = 1.01; p = 0.4517, Fig. 11B).

Quinolinic acid administration also induced hypersensitivity to thermal stimuli, which was still observed at 96 h after treatment ($F_{4,43}$ = 4.00; p = 0.0076). Astaxanthin administration did not affect the response in the healthy animals, whereas its administration (Fig. 11D) prior to quinolinic acid blocked the occurrence of hypersensitivity to the thermal stimulus at 0.5 ($F_{4,44}$ = 16.89; p < 0.0001), 1.5 h ($F_{4,44}$ = 18.22; p < 0.0001), 3 h ($F_{4,44}$ = 23.80; p < 0.0001), 5 h ($F_{4,44}$ = 30.97; p < 0.0001), 24 h ($F_{4,44}$ = 7.12; p = 0.0002) and 72 h ($F_{4,43}$ = 5.60; p = 0.0010) after treatment. Two-way repeated-measures ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the tested time points ($F_{28,351}$ = 3.11; p < 0.0001, Fig. 11D).

An analysis of the AUCs of both behavioral tests revealed that the groups receiving astaxanthin did not exhibit pain-related behaviors after treatment (von Frey - $F_{4,20}$ = 3.49; p = 0.0256; cold plate - $F_{4,20}$ = 17.01; p < 0.0001) (Fig. 11C–E).

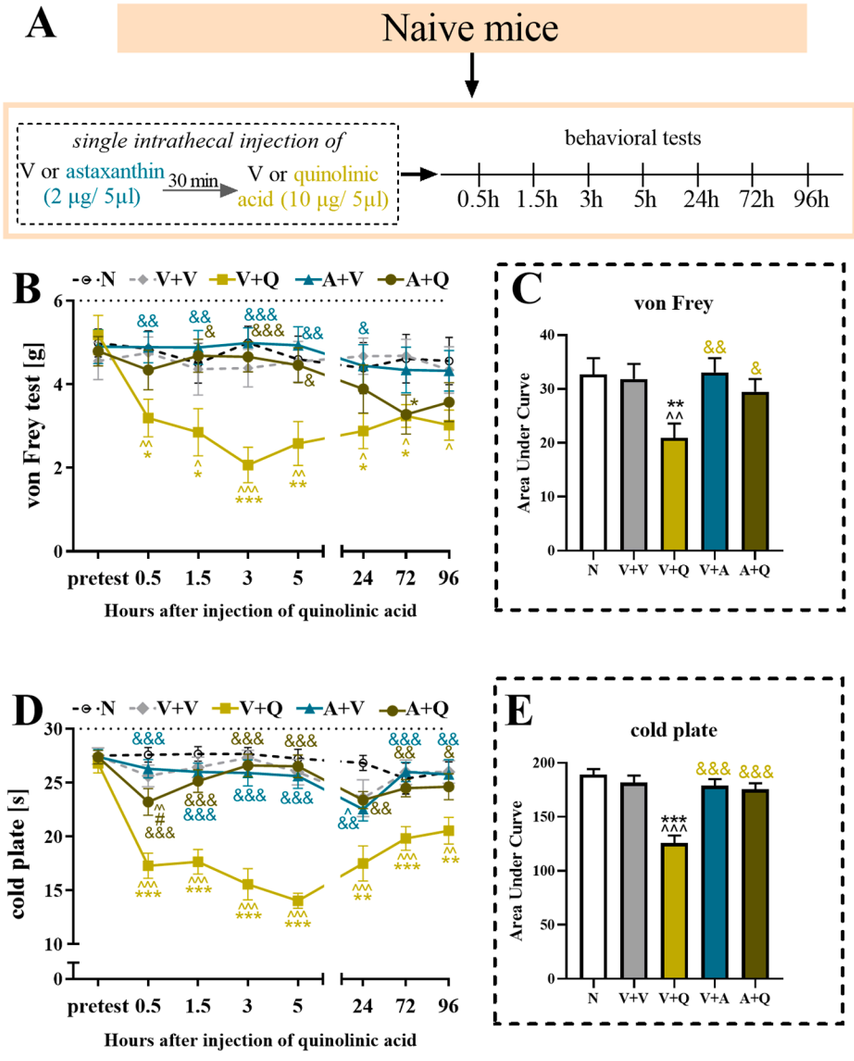


Fig. 11. The influence of a single intrathecal injection of vehicle and quinolinic acid (10 µg/5 µl) preceded by the administration of vehicle or astaxanthin (2 µg/5 µl) to naive male mice on mechanical and thermal hypersensitivity assessed at 0.5, 1.5, 3, 5, 24, 72 and 96 h after treatment (A) using von Frey (B) and cold plate (D) tests, respectively. Additionally, the results obtained from the behavioral tests were analyzed as areas under the curves **(C, E)** to visualize the overall changes in treatment effectiveness. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test. ^p<0.05, ^^p<0.01, and ^^^ p<0.001 indicate differences compared with naive mice; *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 indicate differences compared with V + V-treated mice; &p < 0.05, &&p < 0.01, and &&&p < 0.001 indicate differences compared with the V + Q-treated mice; and #p < 0.05 indicates differences compared with the A + V-treated mice. The dotted lines indicate the cutoff values for the behavioral tests. Abbreviations: A, astaxanthin; N, naive; V, vehicle; Q, quinolinic acid.

Discussion

The findings of this study provide new insights into the potential use of astaxanthin for the treatment of neuropathic pain. These experiments demonstrate that a single intraperitoneal injection of astaxanthin reduces mechanical and thermal hypersensitivity to a similar extent in both male and female mice in the CCI model of neuropathic pain. Importantly, this study provides the first evidence that systemic, repeated administration of astaxanthin in combination with morphine from the onset of treatment effectively delays the development of opioid tolerance and prevents motor impairments in the CCI model of neuropathic pain. Furthermore, even when administered after morphine tolerance has already developed, astaxanthin continues to exert beneficial effects on pain-related behaviors. Notably, twice-daily intraperitoneal administration of astaxanthin, initiated one day prior to nerve injury, results in a sustained and robust analgesic effect. Strikingly, in this treatment regimen, astaxanthin's therapeutic efficacy surpasses that of morphine alone in the neuropathic pain model employed in this study. Our biochemical analyses demonstrate that astaxanthin modulates important molecular targets implicated in neuropathic pain. Specifically, astaxanthin increases Nrf2 protein levels while significantly reducing the expression of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord. These molecular changes suggest two potential mechanisms underlying its analgesic action, further supported by our pharmacological findings. Notably, the ability of astaxanthin to attenuate CCI-induced mechanical and thermal hypersensitivity was abolished by coadministration of trigonelline, a known Nrf2 inhibitor. Additionally, in naive mice, astaxanthin completely prevented hypersensitivity induced by quinolinic acid, an NMDA receptor agonist. Collectively, these results suggest that the analgesic efficacy of astaxanthin involves both activation of the Nrf2 and inhibition of NMDA receptor signaling *via* NR2B subunit modulation. Thus, astaxanthin may represent a promising therapeutic candidate for the treatment of neuropathic pain in the future.

Neuropathic pain, resulting from nerve injury, is a chronic condition that often exhibits resistance to standard therapeutic approaches [3]. In recent years, there has been growing interest in natural compounds with analgesic potential. Among these, astaxanthin has emerged as a promising candidate [9] due to its diverse biological activities and demonstrated efficacy in alleviating both inflammatory and neuropathic pain

[57,58,60,79–81]. In our previous study, we demonstrated that a single intrathecal administration of astaxanthin effectively reduced hypersensitivity in male mice subjected to CCI [57]. The present findings extend these observations by showing, for the first time, that a single intraperitoneal injection of astaxanthin significantly attenuates CCI-induced hypersensitivity, with comparable efficacy observed in both male and female mice. The results obtained are consistent with those reported in 2024 in a model of diabetic neuropathy [60]. Our study presents novel finding: repeated intraperitoneal administration of astaxanthin produced a significant analgesic effect from the beginning to the last day of the experiments. We subsequently investigated whether the concomitant administration of astaxanthin and morphine could enhance their analgesic efficacy in the context of neuropathic pain. Given that repeated morphine use is associated with numerous adverse effects, it is currently considered a third-line treatment option for neuropathic pain [4,82]. The emerging problem in neuropathy is the lower efficacy of opioids and rapid development of morphine tolerance, which requires increasing doses to maintain a satisfactory level of pain relief in patients [83]. Similarly, in our behavioral experiments, we observed a gradual decrease in morphine analgesia after repeated administration in the CCI model; morphine diminished mechanical and thermal hypersensitivity until Days 8–10. Importantly, symptoms of opioid-induced hyperalgesia were also observed at later time points, which is consistent with the available literature [84,85]. To date, the results published in 2023 showed that a single intrathecal injection of astaxanthin in combination with morphine enhanced its analgesic effects on a CCI model [57]. Consequently, we aimed to advance our investigations through repeated intraperitoneal coadministration of the drugs. From a clinical perspective, systemic drug administration is highly important in experimental studies. Notably, the administration of astaxanthin to mice that had already developed tolerance to morphine resulted in partial pain relief and effectively mitigated the onset of opioid tolerance. Intriguingly, in this experimental framework, astaxanthin administered alone yielded significant analgesic effects. In a subsequent experimental design, the coadministration of astaxanthin with morphine during the early phase of neuropathy—employing a preemptive and then repeated injections approach—significantly delayed the development of morphine tolerance. This intervention resulted in a robust and sustained analgesic effect, as demonstrated by a prolonged reduction in both mechanical and thermal hypersensitivity that persisted for the entire 14-day observation period. Notably, repeated administration of astaxanthin maintained its analgesic efficacy over time and exhibited superior therapeutic properties compared to morphine in the neuropathic pain model employed in this study. These findings are further supported by our previous results obtained in diabetic neuropathic pain model, where astaxanthin similarly provided consistent and long-lasting pain relief without signs of diminished effectiveness [60]. Importantly, the results reported by other authors indicate that the oral administration of astaxanthin for three weeks also reduces hypersensitivity in a mouse model of spared nerve injury [56]. Additionally, those authors proved that astaxanthin also attenuated depressive behaviors [56,86], which is important because patients with neuropathic pain often suffer from mood disorders, and antidepressants are used for therapy [87,88]. Notably, astaxanthin has been shown to exert neuroprotective effects following spinal cord and brain injury [51, 81,89], which is in agreement with our results showing that astaxanthin prevents the development of motor disturbances after nerve injury. In conclusion, both our findings and those of previous studies indicate that astaxanthin represents a promising therapeutic candidate for the management of neuropathic pain of diverse etiologies, with evidence suggesting that its long-term administration may confer sustained analgesic benefits.

In subsequent research endeavors, we sought to elucidate the underlying mechanisms through which astaxanthin exerts its notable efficacy in alleviating neuropathic pain, as well as its role in enhancing the effectiveness of morphine. Our investigation aimed to validate the hypotheses proposed by previous studies concerning the potential mechanisms of action of astaxanthin [9]. In vitro studies have shown that astaxanthin may inhibit the polarization of LPS-activated primary microglia [90] and the BV-2 microglial cell line [91] from the M1 phenotype to the M2 phenotype [53]. In addition, the oral administration of astaxanthin decreases the number of Iba1-positive cells in the hippocampus after systematic LPS administration [91]. Therefore, astaxanthin may reduce the degree of microglial/macrophage activation in a neuropathic pain model, as increasing evidence indicates that these cells are highly activated in the spinal cord and contribute to the development of neuropathic pain and opioid tolerance [5,92]. Microglia/macrophages are considered crucial for generating and maintaining neuropathic pain, and their interactions with neurons and astroglia are essential for neuroinflammation [5,92]. Our studies confirmed that CCI induces the upregulation of spinal Iba-1 levels, which is consistent with the literature [64,78,85]. Unexpectedly, astaxanthin did not alter the expression levels of protein markers associated with microglia/macrophages (Iba-1), neurons (cFos), or astrocytes (Gfap) on Day 9 post-CCI. This finding suggests that, contrary to previous reports, modulation of these cell types may not represent the principal mechanism underlying the analgesic effects of astaxanthin in the treatment regimen employed in this study. The data published thus far indicate that astaxanthin can also inhibit MAPKs [58,93–95], which are important in the intracellular modulation of the nociceptive response [5,9,92]. Selective inhibitors of p38 (SB203580 and FR167653) [20,22,96,97], ERK1/2 (U0126, PD98059, and PD198306) [21,24,34,98,99], and JNK (D-JNKI-1JNK and SP600125) [12,100] reduce hypersensitivity in several neuropathic pain models. Moreover, astaxanthin relieves pain by inhibiting p38 and ERK1/2 activation in mouse models of spinal nerve ligation [58] and complete Freund's adjuvant injection [79]. However, in our experiments, the repeated intraperitoneal administration of astaxanthin did not affect the phosphorylation of p38, pERK1/2, pJNK or pNFκB; at least, we did not observe such an effect on Day 9. Data from the literature indicate that p38 can be correlated with microglial activation [20], but in our experiments, astaxanthin did not affect either pp38 or Iba-1 levels; therefore, we assume that the analgesic properties of astaxanthin observed on Day 9 are related to other mechanisms.

Given that the analgesic effects of astaxanthin observed in the CCI model do not appear to result from its influence on the previously mentioned factors, we sought to examine its effect on Nrf2, as astaxanthin has been reported to activate this transcription factor [101]. Under physiological conditions, Nrf2 is located in the cytoplasm through its interaction with Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) [102–104]. In response to oxidative stress, Nrf2 dissociates from Keap1, translocates to the nucleus, and binds to the antioxidant response element known as ARE, a regulatory enhancer sequence, thereby modulating the expression of approximately 250 genes involved in the upregulation of various antioxidant and cytoprotective enzymes [105]. Moreover, activation of Nrf2 has been shown to mitigate mitochondrial dysfunction [74,106–108]. Importantly, Nrf2 downstream interactions may lead to the transcription of several antioxidant enzymes that relieve pain in animal neuropathic pain models [74,107–110]. This finding is consistent with our previous pharmacological results, in which bardoxolone methyl, an Nrf2 activator [111,112], significantly reduced mechanical and thermal hypersensitivity in mice subjected to CCI [57]. Similar effects have also been observed by other researchers on diabetic [113] and ischemic optic [114,115] neuropathy models. Importantly, astaxanthin was recently shown to provide neuroprotection *via* the Nrf2/HO-1 pathway after brain injury [89]. We observed analogous beneficial effects, as astaxanthin effectively mitigated the motor disturbances induced by CCI. Notably, studies from 2011 demonstrated that spinal cord motor neurons exhibit increased susceptibility to oxidative stress, as evidenced by experiments using a Sod1 inhibitor, which exerts growth-inhibitory effects. Importantly, this heightened

vulnerability was effectively attenuated by astaxanthin treatment [116]. However, under the administration regimen we employed, no changes in Sod1 protein expression levels were observed following astaxanthin treatment. We therefore aimed to verify whether the observed beneficial effects of astaxanthin are directly linked to its modulation of Nrf2. Findings from our pharmacological studies provide evidence that Nrf2 may indeed play a pivotal role in mediating the analgesic properties of astaxanthin. Behavioral assessments revealed that intrathecal administration of astaxanthin significantly alleviates both mechanical and thermal hypersensitivity induced by CCI, an effect that was notably abolished by co-administration of the Nrf2 inhibitor trigonelline. These results are particularly important, as they demonstrate for the first time the direct involvement of Nrf2 in the antinociceptive action of astaxanthin in a neuropathic pain model. Furthermore, our findings suggest that Nrf2 may also contribute to the enhanced analgesic efficacy of morphine observed following astaxanthin treatment. This possibility is supported by the latest published data indicating that Nrf2 activators, bardoxolone methyl [57], 5-fluoro-2-oxindole [117] and sulforaphane [118], enhance morphine analgesia. Moreover, our biochemical data revealed decreased Nrf2 protein level after repeated morphine administration, suggesting that this protein is important in the development of tolerance to the analgesic effects of morphine. Our current research provides the first evidence that the repeated administration of astaxanthin with morphine is able to delay tolerance development, which may be related to the increased level of the Nrf2 protein observed on Day 9 after CCI. Importantly, astaxanthin evokes stronger analgesic effects than this opioid drug alone does; in our opinion, this result may be due, among other reasons, to its beneficial effect on Nrf2. Considering the available literature and the findings of subsequent studies, we believe that, from a clinical point of view, the regulation of Nrf2 in neuropathy is extremely important, and its pharmacological modulation by astaxanthin may contribute to more effective therapies.

Interestingly, an additional and distinct mechanism underlying the action of astaxanthin has recently been proposed. *In silico* molecular docking studies have demonstrated that astaxanthin fits into the inhibitory binding pocket of the NR2B subunit of the NMDA receptor, a key component involved in nociceptive signaling [80]. NR2B plays a crucial role in neuropathic pain mechanisms, exhibiting the highest expression among NR2 subunits in the spinal dorsal horn [119]. Importantly, our study revealed a strong downregulation of NR2B protein levels in the spinal cord following astaxanthin administration, consistent with previous observations in rats after spinal cord injury [81]. Moreover, similar effects have been reported with selective NR2B antagonists, which also exhibit analgesic properties in animal pain models [120]. Behavioral investigation of NR2B function is limited by the absence of a selective agonist; therefore, we employed quinolinic acid, an endogenous NMDA receptor ligand acting on both NR2B and NR2A subunits [121]. Previous studies, however, have shown that NR2A-deficient mice develop neuropathic pain comparable to wild-type mice [122], whereas overexpression of NR2B enhances pain-related behaviors [42]. Moreover, NR2A appears to be absent from the peripheral terminals of primary afferent neurons [119]. Notably, quinolinic acid is synthesized within the spinal cord during the development of neuropathic pain, primarily by activated microglia and macrophages [121], and the strong activation/infiltration/proliferation of these cells after CCI was confirmed by our Western blot analysis. Under physiological conditions, quinolinic acid concentration in the nervous system is typically below 100 nM; however, in pathological states, levels can rise significantly, reaching 500–1200 nM [123]. Moreover, a recent study involving over 17 000 patients with chronic pain identified quinolinic acid as one of the most frequently elevated marker associated with pain states [124]. Our study provides the first evidence that intrathecal administration of astaxanthin, followed by quinolinic acid, prevents the development of hypersensitivity to mechanical and thermal stimuli, indicating the involvement of the NMDA receptor in the analgesic mechanism of astaxanthin. Taking into account *in silico* data and the consistency of our results with those obtained using selective NR2B antagonists [120,125,126], this subunit appears to play a key role in astaxanthin's analgesic effects in neuropathy. Current research is focused on the use of NMDA receptor antagonists as key therapeutic agents for pain relief [127]. The analgesic properties of antagonists, such as ketamine, memantine, dextromethorphan, and magnesium, are the subject of intensive experimental and clinical research [128]. Ketamine is frequently used to treat various chronic pain syndromes, especially those that have a neuropathic component [129]. In addition, our biochemical studies revealed that astaxanthin, like ketamine, reduces the expression of the NR2B subunit in the spinal cord, which is related to reduced pain hypersensitivity [130]. Moreover, since the blockade of the NMDA receptor subunit NR2B by Ro 256 981 has already been shown to reduce the development of morphine tolerance [40], we hypothesize that by blocking NR2B, astaxanthin improve the efficacy and prolong the duration of action of morphine in our experiments. Systemic administration of astaxanthin in a mouse model of diabetic neuropathy has been shown to prevent both the development of hypersensitivity and the onset of morphine tolerance [60]. In light of these previously published findings, along with the results of the present study, we propose that astaxanthin - through its ability to inhibit the NR2B subunit of the NMDA receptor - may represent a promising therapeutic strategy for the treatment of neuropathic pain. Nonetheless, further preclinical and clinical investigations are warranted to fully elucidate its efficacy and mechanism of action.

In conclusion, the management of neuropathic pain continues to pose a significant challenge for both patients and healthcare professionals. Individuals affected by this condition often experience chronic symptoms that markedly impair quality of life, while available pharmacological therapies frequently offer only limited and transient relief. In this context, the growing interest in natural compounds as therapeutic agents has brought astaxanthin to the forefront as a promising candidate. Importantly, from a translational perspective, our findings demonstrate that astaxanthin administration not only provides a sustained reduction in pain hypersensitivity but does so without inducing motor deficits. Moreover, it effectively prevents the development of morphine tolerance in a neuropathic pain model. These behavioral effects, together with our biochemical analyses in a murine model, support the conclusion that both activation of the Nrf2 signaling pathway and inhibition of the NR2B subunit of the NMDA receptor are key mechanisms underlying the analgesic properties of astaxanthin. This dual action highlights a complex, multitarget mechanism of analgesia, underscoring astaxanthin's potential as a unique therapeutic tool for addressing neuropathic pain and possibly other pain-related conditions. Furthermore, astaxanthin is already approved as a dietary supplement with a well-established safety profile, further supporting its clinical viability [131]. Of particular significance, two recent clinical studies have reported that astaxanthin-based preparations, PeaNoc XL [132] and FlexPro MD® [133], effectively contribute to the reduction of pain and joint stiffness, highlighting astaxanthin potential therapeutic value. Taken together, our results indicate that astaxanthin holds considerable promise as a therapeutic agent for the treatment of neuropathic pain. Nonetheless, additional preclinical studies and rigorously designed clinical trials are essential to confirm its efficacy and safety across diverse neuropathic conditions.

CRediT authorship contribution statement

Katarzyna Ciapała: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Katarzyna Pawlik:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – review & editing. **Agata Ciechanowska:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Wioletta Makuch:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Joanna Mika:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition,

Investigation, Project administration, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Data availability statement

The data presented in this study are available upon request from the corresponding author.

Ethical approval

All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed. The number of animals was limited to the necessary minimum. The experiments were carried out according to the recommendations and standards of the International Association for the Study of Pain and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the II Ethical Committee of the Maj Institute of Pharmacology of the Polish Academy of Sciences (permission numbers: LKE 75/2023; 18/2023; 153/2023; 242/2024; and 243/2024).

Funding

This research was funded by grants from the National Science Centre, Poland, OPUS 22 2021/43/B/NZ7/00230 and statutory funds from the Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The English language was edited by American Journal Experts (certificate no 7D48-2C1A-9DBB-6560-0CF7).

References

[1] Van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. Pain 2014;155:654–62.
[2] Ghazisaeidi S, Muley MM, Salter MW. Annual review of pharmacology and toxicology neuropathic pain: mechanisms, sex differences, and potential therapies for a global problem. Annu Rev Pharmacol Toxicol is 2023;63:565–83.
[3] Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. Nat Rev Dis Primers 2017;3:17002.
[4] Cavalli E, Mammana S, Nicoletti F, Bramanti P, Mazzon E. The neuropathic pain: an overview of the current treatment and future therapeutic approaches. Int J Immunopathol Pharmacol 2019;33:2058738419838383.
[5] Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B. Importance of glial activation in neuropathic pain. Eur J Pharmacol 2013;716:106–19.
[6] Finnerup NB, Kuner R, Jensen TS. Neuropathic pain: from mechanisms to treatment. Physiol Rev 2021;101:259–301.
[7] Tsuda M. Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. J Diabetes Investig 2016;7:17–26.
[8] Inoue K, Tsuda M. Microglia and neuropathic pain. Glia 2009;57:1469–79.
[9] Ciapała K, Mika J. Advances in neuropathic pain research: selected intracellular factors as potential targets for multidirectional analgesics. Pharm Times 2023;16:1624.
[10] Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. Nat Neurosci 1999;2:1114–9.
[11] Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. Neuron 2002;36:57–68.
[12] Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, Borsello T, Bonny C, Strichartz GR, et al. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. J Neurosci 2006;26:3551–60.
[13] Xu Z, Wang BR, Wang X, Kuang F, Duan XL, Jiao XY, et al. ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase mediate iNOS-induced spinal neuron degeneration after acute traumatic spinal cord injury. Life Sci 2006;79:1895–905.
[14] Karim F, Wang CC, Gereau RW. Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice. J Neurosci 2001;21:3771–9.
[15] Pezet S, Malcangio M, Lever IJ, Perkinton MS, Thompson SWN, Williams RJ, et al. Noxious stimulation induces Trk receptor and downstream ERK phosphorylation in spinal dorsal horn. Mol Cell Neurosci 2002;21:684–95.
[16] Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. J Neurosci 2006;26:4308–17.
[17] Ji R-R, Suter MR. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. Mol Pain 2007;3:33.
[18] Ma W, Quirion R. Partial sciatic nerve ligation induces increase in the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in astrocytes in the lumbar spinal dorsal horn and the gracile nucleus. Pain 2002;99:175–84.
[19] Ma W, Quirion R. The ERK/MAPK pathway, as a target for the treatment of neuropathic pain. Expert Opin Ther Targets 2005;9:699–713.
[20] Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Inoue K. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. Glia 2004;45:89–95.
[21] Zhuang Z-Y, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. Pain 2005;114:149–59.
[22] Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji RR. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. J Neurosci 2003;23:4017–22.
[23] Obata K, Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. Life Sci 2004;74:2643–53.
[24] Popiolek-Barczyk K, Makuch W, Rojewska E, Pilat D, Mika J. Inhibition of intracellular signaling pathways NF-κB and MEK1/2 attenuates neuropathic pain development and enhances morphine analgesia. Pharmacol Rep 2014;66:845–51.
[25] Qu Y-J, Jia L, Zhang X, Wei H, Yue SW. MAPK pathways are involved in neuropathic pain in rats with chronic compression of the dorsal root ganglion. Evidence-Based Complement Altern Med 2016;2016:1–8.
[26] Mika J, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Makuch W, Starowicz K, Przewlocka B. Delta-Opioid receptor analgesia is independent of microglial activation in a rat model of neuropathic pain. PLoS One 2014;9:e104420.
[27] Mika J, Osikowicz M, Makuch W, Przewlocka B. Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. Eur J Pharmacol 2007;560:142–9.
[28] Zychowska M, Rojewska E, Kreiner G, Nalepa I, Przewlocka B, Mika J. Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. J Neuroimmunol 2013;262:35–45.
[29] Deng M, Chen S, Chen H, Luo Y, Dong Y, Pan H. Mitogen-activated protein kinase signaling mediates opioid-induced presynaptic NMDA receptor activation and analgesic tolerance. J Neurochem 2019;148:275–90.
[30] Tian Y, Liu M, Mao-Ying QL, Liu H, Wang ZF, Zhang MT, et al. Early single aspirin-triggered lipoxin blocked morphine anti-nociception tolerance through inhibiting NALP1 inflammasome: involvement of PI3k/Akt signaling pathway. Brain Behav Immun 2015;50:63–77.
[31] Ji RR, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. Brain Res Rev 2009;60:135–48.
[32] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science 2002;298:1911–2.
[33] Gao YJ, Cheng JK, Zeng Q, Xu ZZ, Decosterd I, Xu X, et al. Selective inhibition of JNK with a peptide inhibitor attenuates pain hypersensitivity and tumor growth in a mouse skin cancer pain model. Exp Neurol 2009;219:146–55.
[34] Rojewska E, Popiolek-Barczyk K, Kolosowska N, Piotrowska A, Zychowska M, Makuch W, et al. PD98059 influences immune factors and enhances opioid analgesia in model of neuropathy. PLoS One 2015;10:e0138583.
[35] Zhou YQ, Mei W, Tian XB, Tian YK, Liu DQ, Ye DW. The therapeutic potential of Nrf2 inducers in chronic pain: evidence from preclinical studies. Pharmacol Ther 2021;225:107846.
[36] Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. Science 1996;274:782–4.
[37] Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. Science 1996;274:784–7.
[38] Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, et al. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear Factor-κB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. J Biol Chem 1998;273:3285–90.
[39] Zhou HY, Chen SR, Pan HL. Targeting N-methyl-D-aspartate receptors for treatment of neuropathic pain. Expet Rev Clin Pharmacol 2011;4:379–88.
[40] Ko SW, Wu L-J, Shum F, Quan J, Zhuo M. Cingulate NMDA NR2B receptors contribute to morphine-induced analgesic tolerance. Mol Brain 2008;1:2.
[41] Boyce S, Wyatt A, Webb JK, O'Donnell R, Mason G, Rigby M, et al. Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localisation of NR2B subunit in dorsal horn. Neuropharmacology 1999;38:611–23.
[42] Qu XX, Cai J, Li MJ, Chi YN, Liao FF, Liu FY, et al. Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain. Exp Neurol 2009;215:298–307.
[43] Kartha S, Yan L, Weisshaar CL, Ita ME, Shuvaev VV, Muzykantov VR, et al. Superoxide dismutase-loaded porous polymersomes as highly efficient antioxidants for treating neuropathic pain. Adv Healthcare Mater 2017;6. https://doi.org/10.1002/adhm.201700500. Epub ahead of print 3 September.

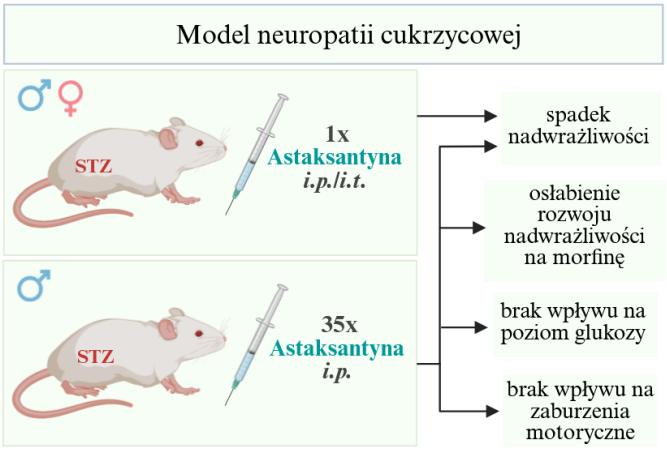
[44] Uchiyama K, Naito Y, Hasegawa G, Nakamura N, Takahashi J, Yoshikawa T. Astaxanthin protects β-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. Redox Rep 2002;7:290–3.
[45] Kohandel Z, Farkhondeh T, Aschner M, Pourbagher-Shahri AM, Samarghandian S. Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases. Biomed Pharmacother 2022;145:112179.
[46] Liu Y-F, Xie W-J, Xi P, Zhang ZC, Chen R, Fu SQ, et al. Astaxanthin alleviates chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome by increasing colonization of Akkermansia muciniphila in the intestine. Phytomedicine 2024;123:155249.
[47] Kupcinskas L, Lafolie P, Lignell Å, Kiudelis G, Jonaitis L, Adamonis K, et al. Efficacy of the natural antioxidant astaxanthin in the treatment of functional dyspepsia in patients with or without Helicobacter pylori infection: a prospective, randomized, double blind, and placebo-controlled study. Phytomedicine 2008;15:391–9.
[48] Taghiyar S, Pourrajab F, Aarabi MH. Astaxanthin improves fatty acid dysregulation in diabetes by controlling the AMPK-SIRT1 pathway. EXCLI J 2023;22:502–15.
[49] Medoro A, Davinelli S, Milella L, Willcox BJ, Allsopp RC, Scapagnini G, et al. Dietary astaxanthin: a promising antioxidant and anti-inflammatory agent for brain aging and adult neurogenesis. Mar Drugs 2023;21:643.
[50] Kishimoto Y, Yoshida H, Kondo K. Potential anti-atherosclerotic properties of astaxanthin. Mar Drugs 2016;14:35.
[51] Bahbah EI, Ghozy S, Attia MS, Negida A, Emran TB, Mitra S, et al. Molecular mechanisms of astaxanthin as a potential neurotherapeutic agent. Mar Drugs 2021;19:201.
[52] Gowd V, Xiao J, Wang M, Chen F, Cheng K. Multi-Mechanistic antidiabetic potential of astaxanthin: an update on preclinical and clinical evidence. Mol Nutr Food Res 2021;65:e2100252.
[53] Babalola JA, Lang M, George M, Stracke A, Tam-Amersdorfer C, Itxaso I, et al. Astaxanthin enhances autophagy, amyloid beta clearance and exerts anti-inflammatory effects in in vitro models of Alzheimer's disease-related blood brain barrier dysfunction and inflammation. Brain Res 2023;1819:148518.
[54] Zaafan MA, Abdelhamid AM. The cardioprotective effect of astaxanthin against isoprenaline-induced myocardial injury in rats: involvement of TLR4/NF-κB signaling pathway. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2021;25:4099–105.
[55] Chang MX, Xiong F. Astaxanthin and its effects in inflammatory responses and inflammation-associated diseases: recent advances and future directions. Molecules 2020;25:5342.
[56] Jiang X, Yan Q, Liu F, Jing C, Ding L, Zhang L, et al. Chronic trans-astaxanthin treatment exerts antihyperalgesic effect and corrects co-morbid depressive like behaviors in mice with chronic pain. Neurosci Lett 2018;662:36–43.
[57] Ciapała K, Rojewska E, Pawlik K, Ciechanowska A, Mika J. Analgesic effects of fisetin, peimine, astaxanthin, Artemisinin, bardoxolone methyl and 740 Y-P and their influence on opioid analgesia in a mouse model of neuropathic pain. Int J Mol Sci 2023;24:9000.
[58] Zhao L, Tao X, Song T. Astaxanthin alleviates neuropathic pain by inhibiting the MAPKs and NF-κB pathways. Eur J Pharmacol 2021;912:174575.
[59] Hashemi B, Fakhri S, Kiani A, Abbaszadeh F, Miraghaee S, Mohammadi M, et al. Anti-neuropathic effects of astaxanthin in a rat model of chronic constriction injury: passing through opioid/benzodiazepine receptors and relevance to its antioxidant and anti-inflammatory effects. Front Pharmacol 2024;15:1467788.
[60] Ciapała K, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J. Astaxanthin has a beneficial influence on pain-related symptoms and opioid-induced hyperalgesia in mice with diabetic neuropathy-evidence from behavioral studies. Pharmacol Rep 2024;76:1346–62.
[61] Li J, Dong D, Sun Y, Wang Q, Li Y, Tao X, et al. Astaxanthin alleviates spinal nerve ligation-induced neuropathic pain by modulating propionic acid levels. Phytomedicine 2025;139:156448.
[62] Bennett G, Xie Y. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain 1988;33:87–107.
[63] Rojewska E, Ciapała K, Mika J. Kynurenic acid and zaprinast diminished CXCL17-evoked pain-related behaviour and enhanced morphine analgesia in a mouse neuropathic pain model. Pharmacol Rep 2019;71:139–48.
[64] Ciechanowska A, Rojewska E, Piotrowska A, Barut J, Pawlik K, Ciapała K, et al. New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies. Front Immunol 2022;13:1058204.
[65] Obara I, Mika J, Schäfer MKH, Przewlocka B. Antagonists of the kappa-opioid receptor enhance allodynia in rats and mice after sciatic nerve ligation. Br J Pharmacol 2003;140:538–46.
[66] Ciapała K, Pawlik K, Ciechanowska A, Mika J, Rojewska E. Effect of pharmacological modulation of the kynurenine pathway on pain-related behavior and opioid analgesia in a mouse model of neuropathic pain. Toxicol Appl Pharmacol 2023;461:116382.
[67] Pawlik K, Ciechanowska A, Ciapała K, Rojewska E, Makuch W, Mika J, et al. Blockade of CC chemokine receptor type 3 diminishes pain and enhances opioid analgesic potency in a model of neuropathic pain. Front Immunol 2021;12:781310.
[68] Lambert LJ, Muzumdar MD, Rideout WM, Jacks T. Basic mouse methods for clinician researchers: harnessing the mouse for biomedical research. Basic Sci Methods Clin Res 2017:291–312.
[69] Kwiatkowski K, Popiolek-Barczyk K, Piotrowska A, Rojewska E, Ciapała K, Makuch W, et al. Chemokines CCL2 and CCL7, but not CCL12, play a significant role in the development of pain-related behavior and opioid-induced analgesia. Cytokine 2019;119:202–13.
[70] Fairbanks CA. Spinal delivery of analgesics in experimental models of pain and analgesia. Adv Drug Deliv Rev 2003;55:1007–41.
[71] Zhang H, Yang W, Li Y, Hu L, Dai Y, Chen J, et al. Astaxanthin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. Int Immunopharmacol 2018;56:18–28.
[72] Zhao YL, Chen SR, Chen H, Pan HL. Chronic opioid potentiates presynaptic but impairs postsynaptic N-Methyl-d-aspartic acid receptor activity in spinal cords. J Biol Chem 2012;287:25073–85.
[73] Jin D, Chen H, Zhou MH, Chen SR, Pan HL. mGluR5 from primary sensory neurons promotes opioid-induced hyperalgesia and tolerance by interacting with and potentiating synaptic NMDA receptors. J Neurosci 2023;43:5593.
[74] Sun J, Li JY, Zhang LQ, Li DY, Wu JY, Gao SJ, et al. Nrf2 activation attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain via induction of PGC-1α-Mediated mitochondrial biogenesis in the spinal cord. Oxid Med Cell Longev 2021;2021:9577874.
[75] Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat Protoc 2006;1:581–5.
[76] Hill ID, Tallarida RJ, Murray RB. Manual of pharmacologic calculations with computer programs. J R Stat Soc Ser C 1982;31:307–8.
[77] Kwiatkowski K, Ciapała K, Rojewska E, Makuch W, Mika J. Comparison of the beneficial effects of RS504393, maraviroc and cenicriviroc on neuropathic pain-related symptoms in rodents: behavioral and biochemical analyses. Int Immunopharmacol 2020;84:106540.
[78] Pawlik K, Ciapała K, Ciechanowska A, Kwiatkowski K, Mika J. Pharmacological evidence of the important roles of CCR1 and CCR3 and their endogenous ligands CCL2/7/8 in hypersensitivity based on a murine model of neuropathic pain. Cells 2022;12:98.
[79] Zhao L, Tao X, Wan C, Dong D, Wang C, Xi Q, et al. Astaxanthin alleviates inflammatory pain by regulating the p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-erythroid factor 2-related factor/heme oxygenase-1 pathways in mice. Food Funct 2021;12:12381–94.
[80] Sharma K, Sharma D, Sharma M, Sharma N, Bidve P, Prajapati N, et al. Astaxanthin ameliorates behavioral and biochemical alterations in in-vitro and in-vivo model of neuropathic pain. Neurosci Lett 2018;674:162–70.
[81] Fakhri S, Dargahi L, Abbaszadeh F, Jorjani M. Astaxanthin attenuates neuroinflammation contributed to the neuropathic pain and motor dysfunction following compression spinal cord injury. Brain Res Bull 2018;143:217–24.
[82] Attal N. Pharmacological treatments of neuropathic pain: the latest recommendations. Rev Neurol (Paris) 2019;175:46–50.
[83] Benyamin R, Trescot AM, Datta S, Buenaventura R, Adlaka R, Sehgal N, et al. Opioid complications and side effects. Pain Physician 2008;11:S105–20.
[84] Mika J, Wawrzczak-Bargiela A, Osikowicz M, Osikowicz M, Makuch W, Przewlocka B, et al. Attenuation of morphine tolerance by minocycline and pentoxifylline in naive and neuropathic mice. Brain Behav Immun 2009;23:75–84.
[85] Bogacka J, Ciapała K, Pawlik K, Kwiatkowski K, Dobrogowski J, Przeklasa-Muszynska A, et al. CCR4 antagonist (C021) administration diminishes hypersensitivity and enhances the analgesic potency of morphine and buprenorphine in a mouse model of neuropathic pain. Front Immunol 2020;11:1241.
[86] Zhou X, Zhang F, Hu X, Chen J, Tang R, Zheng K, et al. Depression can be prevented by astaxanthin through inhibition of hippocampal inflammation in diabetic mice. Brain Res 2017;1657:262–8.
[87] Mika J, Zychowska M, Makuch W, Rojewska E, Przewlocka B. Neuronal and immunological basis of action of antidepressants in chronic pain - clinical and experimental studies. Pharmacol Rep 2013;65:1611–21.
[88] Birkinshaw H, Friedrich CM, Cole P, Eccleston C, Serfaty M, Stewart G, et al. Antidepressants for pain management in adults with chronic pain: a network meta-analysis. Cochrane Database Syst Rev 2023;5:CD014682.
[89] Gao F, Wu X, Mao X, Niu F, Zhang B, Dong J, et al. Astaxanthin provides neuroprotection in an experimental model of traumatic brain injury via the Nrf2/HO-1 pathway. Am J Transl Res 2021;13:1483.
[90] Wen X, Xiao L, Zhong Z, Wang L, Li Z, Pan X, et al. Astaxanthin acts via LRP-1 to inhibit inflammation and reverse lipopolysaccharide-induced M1/M2 polarization of microglial cells. Oncotarget 2017;8:69370–85.
[91] Zhou X, Zhang J, Li Y, Cui L, Wu K, Luo H. Astaxanthin inhibits microglia M1 activation against inflammatory injury triggered by lipopolysaccharide through down-regulating miR-31-5p. Life Sci 2021;267:118943.
[92] Popiolek-Barczyk K, Mika J. Targeting the microglial signaling pathways: new insights in the modulation of neuropathic pain. Curr Med Chem 2016;23:2908–28.
[93] Li Y, Wang Q, Chu C, Liu S. Astaxanthin protects retinal ganglion cells from acute glaucoma via the Nrf2/HO-1 pathway. J Chem Neuroanat 2020;110:101876.
[94] Heidari Khoei H, Fakhri S, Parvardeh S, Shams Mofarahe Z, Baninameh Z, Vardiani M. Astaxanthin prevents the methotrexate-induced reproductive toxicity by targeting oxidative stress in male mice. Toxin Rev 2019;38:248–54.
[95] Eslami M, Esfandyari S, Aghahosseini M, Rashidi Z, Hosseinishental S, Brenjian S, et al. Astaxanthin protects human granulosa cells against oxidative stress through activation of NRF2/ARE pathway and its downstream phase II enzymes. Cell J 2021;23:319–28.
[96] Rojewska E, Popiolek-Barczyk K, Jurga AM, Makuch W, Przewlocka B, Mika J, et al. Involvement of pro- and antinociceptive factors in minocycline analgesia in rat neuropathic pain model. J Neuroimmunol 2014;277:57–66.
[97] Wen YR, Suter MR, Kawasaki Y, Huang J, Pertin M, Kohno T, et al. Nerve conduction blockade in the sciatic nerve prevents but does not reverse the

activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia in the rat spared nerve injury model. Anesthesiology 2007;107:312–21.
[98] Han M, Huang RYY, Du YMM, Zhao ZQQ, Zhang YQQ, et al. Early intervention of ERK activation in the spinal cord can block initiation of peripheral nerve injury-induced neuropathic pain in rats. Sheng Li Xue. Bao 2011;63:106–14.
[99] Ciruela A, Dixon AK, Bramwell S, Gonzalez MI, Pinnock RD, Lee K, et al. Identification of MEK1 as a novel target for the treatment of neuropathic pain. Br J Pharmacol 2003;138:751–6.
[100] He N, Qu YJ, Li DY, Yue SW. RIP3 Inhibition ameliorates chronic constriction injury-induced neuropathic pain by suppressing JNK signaling. Aging (Albany NY) 2021;13:24417–31.
[101] Wu Q, Zhang XS, Wang HD, Zhang X, Yu Q, Li W, et al. Astaxanthin activates nuclear factor erythroid-related factor 2 and the antioxidant responsive element (Nrf2-ARE) pathway in the brain after Subarachnoid Hemorrhage in rats and attenuates early brain injury. Mar Drugs 2014;12:6125–41.
[102] Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 2018;1865:721–33.
[103] He F, Ru X, Wen T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. Int J Mol Sci 2020;21:1–23.
[104] Robledinos-Antón N, Fernández-Ginés R, Manda G, Manda G, Cuadrado A. Activators and inhibitors of NRF2: a review of their potential for clinical development. Oxid Med Cell Longev 2019;2019:9372182.
[105] Gall Trošelj K, Tomljanović M, Jaganjac M, Matijević Glavan T, Čipak Gašparović A, Milković L, et al. Oxidative stress and cancer heterogeneity orchestrate NRF2 roles relevant for therapy response. Molecules 2022;27:1468.
[106] Brandes MS, Gray NE. NRF2 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. ASN Neuro 2020;12. https://doi.org/10.1177/1759091419899782/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1759091419899782-FIG2.JPEG. Epub ahead of print 21 January.
[107] Feng F, Qiu H. Neuroprotective effect of tanshinone IIA against neuropathic pain in diabetic rats through the Nrf2/ARE and NF-κB signaling pathways. Kaohsiung J Med Sci 2018;34:428–37.
[108] Zhou Y, Liu DQ, Chen SP, Chen N, Sun J, Wang XM, et al. Nrf2 activation ameliorates mechanical allodynia in paclitaxel-induced neuropathic pain. Acta Pharmacol Sin 2020;41:1041–8.
[109] Basu P, Averitt DL, Maier C, Basu A. The effects of nuclear factor Erythroid 2 (NFE2)-Related factor 2 (Nrf2) activation in preclinical models of peripheral neuropathic pain. Antioxidants 2022;11:430.
[110] Wang L, He C. Nrf2-mediated anti-inflammatory polarization of macrophages as therapeutic targets for osteoarthritis. Front Immunol 2022;13:967193.
[111] Yates MS, Tauchi M, Katsuoka F, Flanders KC, Liby KT, Honda T, et al. Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes. Mol Cancer Therapeut 2007;6:154–62.
[112] Wu J, Liu X, Fan J, Chen W, Wang J, Zeng Y, et al. Bardoxolone methyl (BARD) ameliorates aristolochic acid (AA)-induced acute kidney injury through Nrf2 pathway. Toxicology 2014;318:22–31.
[113] Kalvala AK, Kumar R, Sherkhane B, Gundu C, Arruri VK, Kumar A, et al. Bardoxolone methyl ameliorates hyperglycemia induced mitochondrial dysfunction by activating the keap1-Nrf2-ARE pathway in experimental diabetic neuropathy. Mol Neurobiol 2020;57:3616–31.
[114] Chien JY, Chou YY, Ciou JW, Liu FY, Huang SP. The effects of two Nrf2 activators, bardoxolone methyl and omaveloxolone, on retinal ganglion cell survival during ischemic optic neuropathy. Antioxidants 2021;10:1–18.
[115] Lin WN, Kapupara K, Wen YT, Chen YH, Pan IH, Tsai RK. Haematococcus pluvialis-derived astaxanthin is a potential neuroprotective agent against optic nerve ischemia. Mar Drugs 2020;18:85.
[116] Isonaka R, Hiruma H, Katakura T, Kawakami T. Inhibition of superoxide dismutase selectively suppresses growth of rat spinal motor neurons: comparison with phosphorylated neurofilament-containing spinal neurons. Brain Res 2011;1425:13–9.
[117] Ferreira-Chamorro P, Redondo A, Riego G, Pol O. Treatment with 5-fluoro-2-oxindole increases the antinociceptive effects of morphine and inhibits neuropathic pain. Cell Mol Neurobiol 2021;41:995–1008.
[118] Ferreira-Chamorro P, Redondo A, Riego G, Leánez S, Pol O. Sulforaphane inhibited the nociceptive responses, Anxiety- and depressive-like behaviors associated with neuropathic pain and improved the anti-allodynic effects of morphine in mice. Front Pharmacol 2018;9:1332.
[119] Wu LJ, Zhuo M. Targeting the NMDA receptor subunit NR2B for the treatment of neuropathic pain. Neurotherapeutics 2009;6:693–702.
[120] Kim Y, Cho HY, Ahn YJ, Kim J, Yoon YW. Effect of NMDA NR2B antagonist on neuropathic pain in two spinal cord injury models. Pain 2012;153:1022–9.
[121] Guillemin GJ. Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. FEBS J 2012;279:1356–65.
[122] Abe T, Matsumura S, Katano T, Mabuchi T, Takagi K, Xu L, et al. Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain. Eur J Neurosci 2005;22:1445–54.
[123] Braidy N, Grant R, Brew BJ, Adams S, Jayasena T, Guillemin GJ, et al. Effects of kynurenine pathway metabolites on intracellular NAD+ synthesis and cell death in human primary astrocytes and neurons. Int J Tryptophan Res 2009;2:61–9.
[124] Gunn J, Hill MM, Cotton BM, Deer TR. An analysis of biomarkers in patients with chronic pain. Pain Physician 2020;23:E41–9.
[125] Chizh BA, Headley PM, Tzschentke TM. NMDA receptor antagonists as analgesics: focus on the NR2B subtype. Trends Pharmacol Sci 2001;22:636–42.
[126] Mihara Y, Egashira N, Sada H, Kawashiri T, Ushio S, Yano T, et al. Involvement of spinal NR2B-containing NMDA receptors in oxaliplatin-induced mechanical allodynia in rats. Mol Pain 2011;7:8.
[127] Thompson T, Whiter F, Gallop K, Veronese N, Solmi M, Newton P, et al. NMDA receptor antagonists and pain relief: a meta-analysis of experimental trials. Neurology 2019;92:e1652–62.
[128] Kreutzwiser D, Tawfic QA. Expanding role of NMDA receptor antagonists in the management of pain. CNS Drugs 2019;33:347–74.
[129] Niesters M, Martini C, Dahan A. Ketamine for chronic pain: risks and benefits. Br J Clin Pharmacol 2014;77:357–67.
[130] Seo EH, Piao L, Cho EH, Hong SW, Kim SH. The effect of ketamine on endoplasmic reticulum stress in rats with neuropathic pain. Int J Mol Sci 2023;24:5336.
[131] Liao Y, Wang H, Li S, Xue Y, Chen Y, Adu-Frimpong M, et al. Preparation of astaxanthin-loaded composite micelles with coaxial electrospray technology for enhanced oral bioavailability and improved antioxidation capability. J Sci Food Agric 2024;104:1408–19.
[132] Kadanangode Narayanaswam N, Caston E, Satish Kumar RC, Vijayakumar TM, Vanangamudi VS, Pankaj N, et al. A randomized interventional clinical trial assessing the safety and effectiveness of PeaNoc XL tablets in managing joint pain and inflammation in arthritis patients. F1000Research 2023;12:895.
[133] Park MH, Jung JC, Hill S, Cartwright E, Dohnalek MH, Yu M, et al. FlexPro MD®, a combination of krill oil, astaxanthin and hyaluronic acid, reduces pain behavior and inhibits inflammatory response in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. Nutrients 2020;12:956.

4.6. Zbadanie wpływu wielokrotnych dootrzewnowych podań astaksantyny na nadwrażliwość oraz rozwój tolerancji morfinowej w mysim modelu neuropatii cukrzycowej – *praca oryginalna* Ciapała i wsp., *Pharmacological Reports*, 2024

Przeprowadzone w ramach poprzednich publikacji eksperymenty udowodniły, że pojedyncze podanie podpajęczynówkowe lub dootrzewnowe astaksantyny wywołuje spadek nadwrażliwości dotykowej i termicznej, a także poprawia skuteczność leków opioidowych po podwiązaniu nerwu kulszowego (Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2023[171], *Neurotherapeutics*, 2025[173]). Biorąc pod uwagę te wyniki, a także coraz większe zainteresowanie związkami naturalnymi o wielokierunkowym mechanizmie działania, w kolejnych eksperymentach postanowiliśmy zweryfikować, czy substancja ta będzie równie efektywna w modelu neuropatii o innej etiologii. Cukrzyca jest chorobą metaboliczną prowadzącą do poważnych powikłań, takich jak uszkodzenie nerek, udary czy amputacje kończyn, a liczba chorych nieustannie wzrasta[218]. Przewlekła hiperglikemia powoduje uszkodzenie nerwów, co sprzyja rozwojowi bolesnej neuropatii, w której leki opioidowe często nie zapewniają skutecznej ulgi[219]. Wykazano, że czynnik transkrypcyjny Nrf2 odgrywa kluczową rolę w ochronie komórek nerwowych przed stresem oksydacyjnym, który również stanowi jeden z głównych czynników przyczyniających się do rozwoju neuropatii cukrzycowej[220]. Co ciekawe, w szczurzym modelu neuropatii cukrzycowej stwierdzono zwiększoną aktywność i ekspresję receptorów NMDA w rdzeniu kręgowym, obejmującą zarówno nadmierną ekspresję mRNA, jak i podwyższone poziomy białka podjednostki NR2B[221]. W świetle przedstawionych danych, a w szczególności udokumentowanej zdolności astaksantyny do aktywacji Nrf2 oraz blokowania podjednostki NR2B receptora NMDA, celem naszych kolejnych badań było sprawdzenie jej skuteczności również w modelu neuropatii cukrzycowej.

Po raz pierwszy wykazaliśmy, że pojedyncze podanie astaksantyny nie tylko drogą podpajęczynówkową, ale i dootrzewnową, skutecznie zmniejsza nadwrażliwość dotykową i termiczną w modelu neuropatii cukrzycowej, zarówno u samców jak i u samic myszy (**Rycina 11**). Co ważne, zaobserwowaliśmy również, że wielokrotne, dootrzewnowe podania astaksantyny, chociaż nie wpływają na poziom glukozy we krwi, skutecznie obniżają nadwrażliwość bólową, i co więcej, częściowo opóźniają rozwój tolerancji morfinowej i znacząco zapobiegając wystąpieniu zjawiska nadwrażliwości indukowanej morfiną. Co istotne, w przeprowadzonych eksperymentach nie zaobserwowaliśmy po podaniach astaksantyny niekorzystnego wpływu na masę ciała zwierząt oraz ich koordynację ruchową.



Rycina 11. *Wyniki eksperymentów behawioralnych po podaniach astaksantyny w modelu neuropatii cukrzycowej.*

Podsumowując, przeprowadzone eksperymenty dostarczyły pierwszych dowodów na to, że astaksantyna skutecznie łagodzi objawy bólu neuropatycznego w modelu neuropatii cukrzycowej u obu płci, a ponadto, co szczególnie ważne, zapobiega rozwojowi nadwrażliwości indukowanej morfiną. Uzyskane wyniki wskazują, że substancja ta może stanowić obiecującą opcję terapeutyczną również w neuropatii cukrzycowej u obu płci – zarówno samodzielnie jak i w terapii skojarzonej z morfiną – co czyni ją interesującym kandydatem do dalszych badań przedklinicznych i klinicznych.

Pharmacological Reports (2024) 76:1346–1362
https://doi.org/10.1007/s43440-024-00671-9

RESEARCH

Astaxanthin has a beneficial influence on pain-related symptoms and opioid-induced hyperalgesia in mice with diabetic neuropathy-evidence from behavioral studies

Katarzyna Ciapała[1] · Katarzyna Pawlik[1] · Agata Ciechanowska[1] · Wioletta Makuch[1] · Joanna Mika[1]

Received: 4 September 2024 / Revised: 14 October 2024 / Accepted: 15 October 2024 / Published online: 12 November 2024
© The Author(s) 2024

Abstract

Background The treatment of painful diabetic neuropathy is still a clinical problem. The aim of this study was to determine whether astaxanthin, a substance that inhibits mitogen-activated protein kinases, activates nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and influences N-methyl-D-aspartate receptor, affects nociceptive transmission in mice with diabetic neuropathy.

Methods The studies were performed on streptozotocin-induced mouse diabetic neuropathic pain model. Single intrathecal and intraperitoneal administrations of astaxanthin at various doses were conducted in both males and females. Additionally, repeated twice-daily treatment with astaxanthin (25 mg/kg) and morphine (30 mg/kg) were performed. Hypersensitivity was evaluated with von Frey and cold plate tests.

Results This behavioral study provides the first evidence that in a mouse model of diabetic neuropathy, single injections of astaxanthin similarly reduce tactile and thermal hypersensitivity in both male and female mice, regardless of the route of administration. Moreover, repeated administration of astaxanthin slightly delays the development of morphine tolerance and significantly suppresses the occurrence of opioid-induced hyperalgesia, although it does not affect blood glucose levels, body weight, or motor coordination. Surprisingly, astaxanthin administered repeatedly produces a better analgesic effect when administered alone than in combination with morphine, and its potency becomes even more pronounced over time.

Conclusions These behavioral results provide a basis for further evaluation of the potential use of astaxanthin in the clinical treatment of diabetic neuropathy and suggest that the multidirectional action of this substance may have positive effects on relieving neuropathic pain in diabetes.

Highlights

In a mouse model of diabetic neuropathic pain, astaxanthin:
- attenuates pain-related behavior in male and female mice after a single administration.
- slightly delays the development of tolerance after repeated administration.
- does not disturb motor coordination and does not influence blood glucose levels.
- produces long-lasting, better than morphine, analgesia after repeated administration.

Keywords Astaxanthin · Morphine · Neuropathic pain · Diabetes · Opioid-induced hyperalgesia

Abbreviations

A	Astaxanthin
ANOVA	Analysis of variance
AUC	Area under curve
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ED	Effective dose
ERK	Extracellular-regulated kinase
ip	Intraperitoneal
it	Intrathecal

✉ Joanna Mika
joamika@if-pan.krakow.pl

[1] Department of Pain Pharmacology, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Smętna 12, Kraków 31-343, Poland

JNK	C-Jun N-terminal – kinase
M	Morphine
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
N	Naive
NMDA	N-methyl-D-aspartate
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OIH	Opioid-induced hyperalgesia
SEM	Standard error of the mean
STZ	Streptozotocin
V	Vehicle

Introduction

Diabetes mellitus is a metabolic disease that, over time, leads to serious consequences, such as blindness, heart attacks, kidney failure, stroke, or lower limb amputation. The number of people suffering from diabetes increased from 108 million in 1980 to 422 million in 2014 [1]. Importantly, chronic hyperglycemia causes nerve damage, which consequently may induce the development of neuropathic pain [2]. Even opioids, which are among the strongest analgesics, do not provide sufficient pain relief in patients with diabetic neuropathy, and their long-term use is associated with side effects [3].

The molecular basis of diabetic neuropathy is complex and still not fully known [2, 4–8]. Interestingly, it has been reported that among patients with diabetes, males develop neuropathy earlier than females and have a greater frequency of pain [9, 10], while women are more likely to have more severe neuropathic pain symptoms [11, 12]. There is an increasing need for studies to identify the most potent drugs or their combinations for the treatment of diabetic neuropathic pain to obtain a satisfactory analgesic effect and improve the quality of life of affected individuals.

It is currently believed that neuronal and immune cells play key roles in the development of neuropathic pain [13–15], and notably, their activation is closely related to the disruption of certain intracellular signaling pathways [16]. One of these cascades which regulates the nociceptive response is the mitogen-activated protein kinases (MAPK) family. This is an evolutionarily conserved group that consists of the p38 mitogen-activated protein (p38), extracellular-regulated (ERK), and c-Jun N-terminal (JNK) kinases [17–19]. A lot of previous research has indicated that MAPKs are involved in the modulation of nociceptive signals and central sensitization [20–24] and opioid effectiveness [25–29]. In recent years, a variety of selective MAPK inhibitors, e.g., SB203580, D-JNKI-1, SP600125, and PD198306, have been shown to significantly attenuate tactile and thermal hypersensitivity in animal models [23, 30, 31]. Moreover, some evidence implies that, among transcription factors, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) may be an important target for the pharmacological treatment of neuropathic pain [32]. Recent studies have indicated that a single intrathecal (*it*) injection of astaxanthin, a substance that inhibits MAPKs and activates Nrf2 [33–36], provides pain relief and improves opioid effectiveness in male mice exposed to sciatic nerve injury [37]. Moreover, it has recently been suggested that this substance also acts through N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, which are very important for pain processes [38, 39]. Astaxanthin is a carotenoid primarily present in marine organisms [40]. It has gained significant attention for its therapeutic advantages in conditions related to various diseases via its potential to improve oxidative stress, inflammation, and lipid/glucose metabolism [40, 41]. Recently, PeaNoc XL (containing 1 mg of astaxanthin) has been shown to reduce pain and joint stiffness in patients with arthritis [42].

Therefore, in light of the lack of knowledge regarding the usefulness of astaxanthin in the treatment of diabetic neuropathy, the goal of our first behavioral experiments was to determine the effects of single *it* and intraperitoneal (*ip*) injections of this substance on tactile and thermal hypersensitivity in male and female mice with streptozotocin (STZ)-induced diabetic neuropathic pain. Furthermore, the second behavioral study performed only in male mice was aimed to evaluate whether and how repeated *ip* injections of astaxanthin influence pain relief, morphine tolerance development, glucose levels, body weight, and motor coordination in a model of diabetic neuropathic pain.

Materials and methods

Animals

Male and female albino Swiss mice (20–22 g) were acquired from Charles River (Hamburg, Germany) and held in cages with sawdust on a standard 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 06:00 a.m.), with food and water available *ad libitum*. All of the procedures were carried out in agreement with the recommendations of the International Association for the Study of Pain [43] and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the II Local Ethics Committee of the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences (LKE 252/2023; 128/2023; 124/2024). Care was taken to minimize animal suffering and reduce the number of animals used in the experiments (3R policy). The total number of animals in the following study is 185.

Diabetic neuropathic pain model

Streptozotocin (STZ) is one of the chemical components most commonly used in experimental diabetes research [44–47] since it causes specific necrosis of the pancreatic beta cells [48, 49]. In our experiments, a single intraperitoneal (*ip*) injection of STZ (200 mg/kg; Sigma Aldrich, St. Louis, USA), dissolved in water, was used to establish a diabetes type 1 model in 5–6 weeks old mice [27]. As a control group, age-matched nondiabetic (naive) mice received water instead. Blood was collected from the tail veins of the mice, and the glucose concentration was measured with an Accu-Chek Active glucometer (Warsaw, Poland). The measurement range of the glucometer ends at 600 mg/dL. The mice were considered to have developed diabetes when their glucose level was greater than 300 mg/dL between days 5 and 7 after STZ injection. On days 5–7 after surgery, the majority of STZ-exposed mice fully developed tactile and thermal hypersensitivity compared to that of naive animals, as measured by the von Frey and cold plate tests. Mice were randomly selected for the experimental groups. After administering STZ, we observed that the average glucose level in males was 569 and that in females was 580 mg/dL.

Pharmacological study

The following compounds were used in our experiments: astaxanthin (A; MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA) and morphine hydrochloride (M; Fagron, Krakow, Poland). Substances were administered by intrathecal (*it*) or *ip* injection. Astaxanthin solutions were red-purple, while the vehicles were transparent. The *it* route of administration is a standard procedure in our laboratory [37, 50]. It is achieved by using a Hamilton syringe with a thin needle in accordance with the guidelines described previously [51]. The injections were performed in the lumbar segment of the spinal cord (between the L5 and L6 vertebrae) with a volume of 5 µl, and the tail reflex was used as an indicator of proper administration.

Dose-dependency study

Astaxanthin was administered *it* at doses of 0.5, 1, 2, or 4 µg/5 µl or *ip* at doses of 1, 10, 25, or 50 mg/kg on day 7 after STZ treatment. These doses were selected based on our previous studies and the available literature [37, 52]. The behavioral tests were conducted 0.5, 1.5, 3, 5, and 24 h after these injections. The control groups for *it* administration were injected with 60% DMSO (5 µl) at the same time points, while the control groups for *ip* administration received 30% propylene glycol.

Repeated coadministration of astaxanthin with morphine

In STZ-treated male mice, tolerance development and opioid-induced hyperalgesia were studied by administering morphine twice daily at the dose of 30 mg/kg, *ip* (similarly as described by others [53, 54]) with or without astaxanthin (twice daily 25 mg/kg, *ip*) for 17 days, starting from the 5th day after STZ injection. In the experimental groups, astaxanthin was administered twice daily, 30 min before each morphine injection, for the following 17 days. The behavioral tests were conducted 30 min after morning morphine administration, in the initial phase (up to day 7) every second day and later, due to the rapidly developing morphine tolerance, daily. Additionally, on days 9 and 17, after behavioral tests blood glucose concentrations, motor coordination, and body weight measurements were performed.

Behavioral tests

Von Frey test

Mechanical hypersensitivity was measured using calibrated nylon monofilaments of increasing strength (0.6 to 6 g; 6 g is the cutoff latency) (Ugo Basile, Gemonio, Italy) to observe reactions to tactile stimuli, as described previously [55]. The mice were habituated in plastic cages with a wire mesh floor 5 min before the experiment, and von Frey filaments were applied to the midplantar surface of the hind paws until the limbs were lifted. This test is used regularly in our laboratory [56, 57].

Cold plate test

Thermal hypersensitivity was measured using a cold plate analgesia meter (Ugo Basile, Gemonio, Italy) as described previously [58]. The temperature of the cold plate was maintained at 2 °C, and the cutoff latency was 30 s. The mice were positioned on the cold plate separately, and the latency to lift the hind paw was noted. Both hind paws in naive and STZ-exposed mice were observed simultaneously. This test is used regularly in our laboratory [56, 57].

Rotarod test

The rotarod test is a frequently used method to assess motor coordination in animals and was used in our previous studies [59]. The mice were placed in separate compartments on a horizontal rod that rotated at an accelerating speed, starting at 2 rpm and reaching 40 rpm within 300 s. The animals were acclimated to the apparatus and trained on the rotating rod. The time until the mouse fell off the rod was recorded.

The rotarod test was conducted as a part of a repeated administration study, 1 h after morphine administration on days 9 and 17. The cutoff latency was 300 s.

Data analysis

The Shapiro-Wilk test was performed to evaluate the normality of variable distributions (significance level $\alpha = 0.01$). The behavioral data are presented as the means ± SEM in grams or seconds. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the experimental results, followed by the Bonferroni post hoc test of selected pairs, measured separately at each time point. The results shown in Figs. 1, 2 and 3, and 4 were additionally evaluated using two-way repeated measures ANOVA to detect time–drug interactions, and in the case of Figs. 3 and 4 also to investigate the occurrence of opioid-induced hyperalgesia. In addition, we have added the area under the curve (AUC) results as an inserts to visualize efficacy of each dose between sexes (Figs. 1 and 2) and to compare the effectiveness of the each treatment in two intervals (1–9 days and 10–17 days) in Figs. 3 and 4 - this data were evaluated using t-test. The AUC was calculated by trapezoidal and Simpson's rules, as described by Tallarida and Murray [60]. The Litchfield and Wilcoxon method was applied to determine the antinociceptive dose necessary to produce a 50% response (ED_{50}) and the 95% confidence intervals of the quantitative data, which were automatically calculated with Pharm/PCS software (version 4) for the results obtained 1.5 h after drug administration. In the experiment with chronic astaxanthin and morphine administration, the area under the curve was calculated to compare the effects of the tested substances between selected time intervals. All of the statistical analyses and graphs were performed using Prism (version 9.1.2 (226), GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Effect of a single administration of astaxanthin on tactile and thermal hypersensitivity on the 7th day after STZ treatment in male and female mice

Single *it* administrations of astaxanthin at different doses (0.5, 1, 2, and 4 µg/5 µl) were performed on day 7 after STZ injection in male and female mice (Fig. 1A), and the influence of the drug on hypersensitivity to tactile (Fig. 1B, D) and thermal (Fig. 1C, E) stimuli was measured.

According to the von Frey test, astaxanthin reduced mechanical hypersensitivity in both sexes. In males, the most effective dose of astaxanthin was 4 µg/5 µl, which had the greatest effect on mechanical hypersensitivity at 1.5 h ($F_{4,35}$=4.753; $p = 0.0036$) after injection; however, this effect was also significant after 3 h (Fig. 1B). A dose of 2 µg/5 µl had an analgesic effect 3 h after administration ($F_{4,34}$=4.788; $p = 0.0036$), while doses of 0.5 and 1 µg/5 µl reduced mechanical hypersensitivity only 0.5 h after injection ($F_{4,35}$=3.562; $p = 0.0154$). Analgesic effects were no longer observed 24 h after administration (Fig. 1B). Two-way repeated measures ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the tested time points ($F_{20,206}$=2.732; $p = 0.0002$). Similarly, astaxanthin at the highest dose of 4 µg/5 µl significantly reduced mechanical hypersensitivity at 1.5 ($F_{4,34}$=2.713; $p = 0.0461$) and 3 h ($F_{4,34}$=3.061; $p = 0.0295$) after administration in female mice (Fig. 1D). A dose of 2 µg/5 µl had an analgesic effect only 1.5 h after injection (Fig. 1D). Two-way repeated measures ANOVA did not confirm a significant interaction between the investigated treatment and the tested time points. Moreover, analysis of the area under the curve, which was performed for each dose used, revealed that after *it* administration, astaxanthin had a similar effect on hypersensitivity to mechanical stimuli in both male and female mice with diabetic neuropathic pain (Fig. 1F).

According to the cold plate test, astaxanthin reduced thermal hypersensitivity in both genders. In males, the best analgesic effects were observed at a dose of 4 µg/5 µl 5 h after administration ($F_{4,33}$=8.783; $p < 0.0001$); however, this effect was also significant 1.5 and 3 h after injection (Fig. 1C). A dose of 2 µg/5 µl had an analgesic effect only 5 h after administration, while doses of 0.5 and 1 µg/5 µl did not reduce thermal hypersensitivity at any tested time point (Fig. 1C). Two-way repeated measures ANOVA did not confirm a significant interaction between the investigated treatment and the subjected time point. Similarly, astaxanthin at the highest dose of 4 µg/5 µl evoked the most significant reduction in thermal hypersensitivity at 3 h ($F_{4,33}$=7.937; $p = 0.0001$) after administration in female mice; however, this effect was also significant at 5 h after injection ($F_{4,33}$=3.135; $p = 0.0273$) (Fig. 1E). The doses of 1 and 2 µg/5 µl had analgesic effects only 3 h after injection (Fig. 1E). Analgesic effects were no longer observed 24 h after administration. Two-way repeated measures ANOVA confirmed a significant interaction between the treatment and the tested time points ($F_{20,196}$=2.323; $p = 0.0017$). Moreover, analysis of the area under the curve in the cold plate test showed that after *it* administration, astaxanthin had a similar effect on hypersensitivity to thermal stimuli in both male and female mice with diabetic neuropathic pain (Fig. 1G).

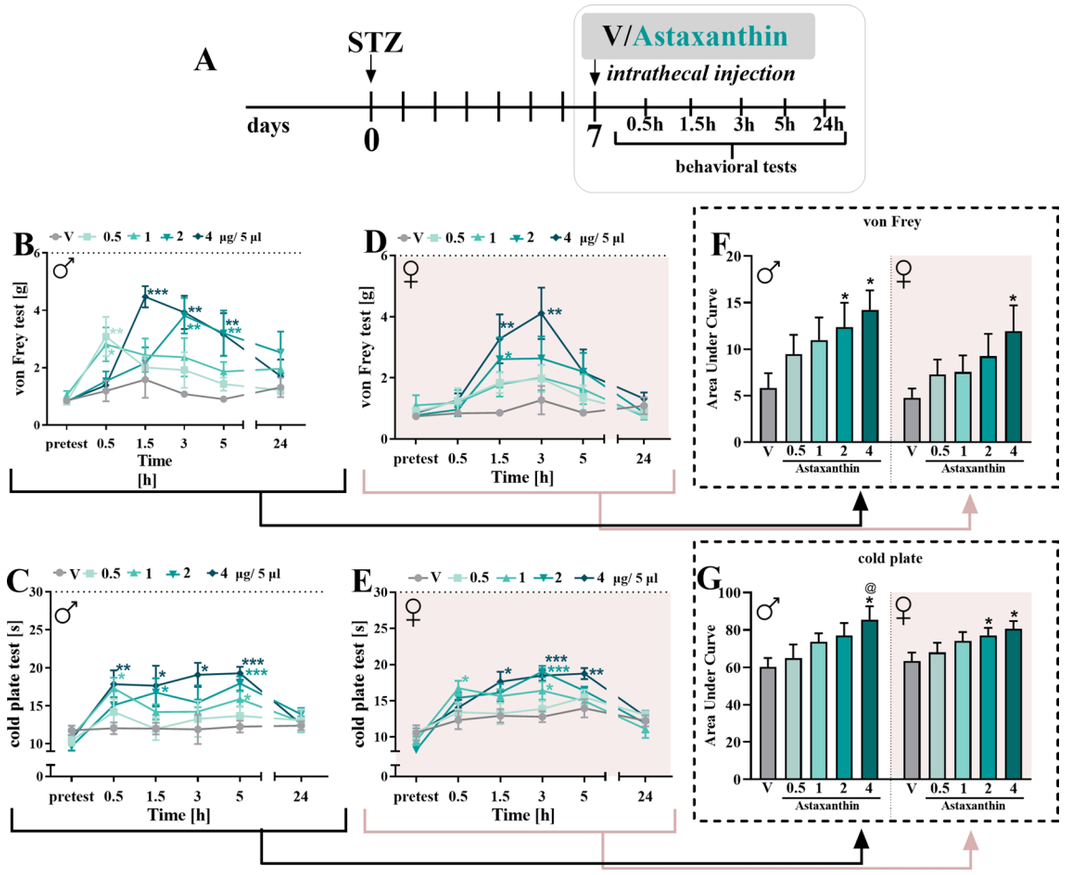


Fig. 1 Influence of *it* astaxanthin administration on pain-related behavior in STZ-treated male and female mice **(A)**. The effects of injections of astaxanthin (0.5, 1, 2 and 4 µg/5µL) on tactile and thermal hypersensitivity were assessed at 0.5, 1.5, 3, 5 and 24 h after treatment on the 7th day post-STZ in males **(B**, **C)** and females **(D**, **E).** The data are presented as the means ± SEMs and the numbers of animals are as follow: males: V = 7–8; 0.5 µg/5µL = 7–8; 1 µg/5µL = 8; 2 µg/5µL = 8; 4 µg/5µL = 7–8 and females: V = 7; 0.5 µg/5µL = 7–8; 1 µg/5µL = 6–8; 2 µg/5µL = 8; 4 µg/5µL = 6–8. Additionally, the data obtained from the von Frey (**B**,**D**) and cold plate (**C**,**E**) tests were analyzed as areas under the curve (**F**,**G**) to visualize overall changes between doses efficacy. The intergroup differences were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ indicate differences between V-treated STZ-exposed mice and substance-treated STZ-exposed mice; @ $p < 0.05$ indicates differences between animals treated with astaxanthin at the dose of 0.5 µg/5 µL. Moreover, treatment x time points interaction were measured using two-way repeated measures ANOVA. The dotted lines indicate the cutoff values for the tests

The effect of a single *ip* administration of astaxanthin on tactile and thermal hypersensitivity on the 7th day after STZ treatment in male and female mice

Single *ip* injections of astaxanthin at different doses (1, 10, 25, and 50 mg/kg) were performed on day 7 after STZ administration in male and female mice (Fig. 2A), and the influence of the drug on hypersensitivity to tactile (Fig. 2B, D) and thermal (Fig. 2C, E) stimuli was measured.

According to the von Frey test, astaxanthin reduced mechanical hypersensitivity in both sexes. In male mice, the most effective dose of this substance was 50 mg/kg, which had the greatest effect on mechanical hypersensitivity at 0.5 h ($F_{4,29}$=23.47; $p < 0.0001$); however, this dose was also effective at 1.5 h and 3 h after injection (Fig. 2B). A dose of 25 mg/kg showed an analgesic effect 1.5 h after administration ($F_{4,29}$=7.772; $p = 0.0002$), while the other doses of 1 and 10 mg/kg did not cause a decrease in mechanical hypersensitivity at any time point after treatment. Analgesic effects were no longer observed 24 h after administration (Fig. 2B). Two-way repeated measures ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the tested time points ($F_{20,174}$=3.145; $p < 0.0001$). Similarly, at the highest dose of 50 mg/kg, astaxanthin caused the greatest reduction in mechanical hypersensitivity at 0.5 h ($F_{4,26}$=3.879; $p = 0.0134$) after administration, but it was also effective at 1.5 h ($F_{4,26}$=6.091; $p = 0.0013$) and

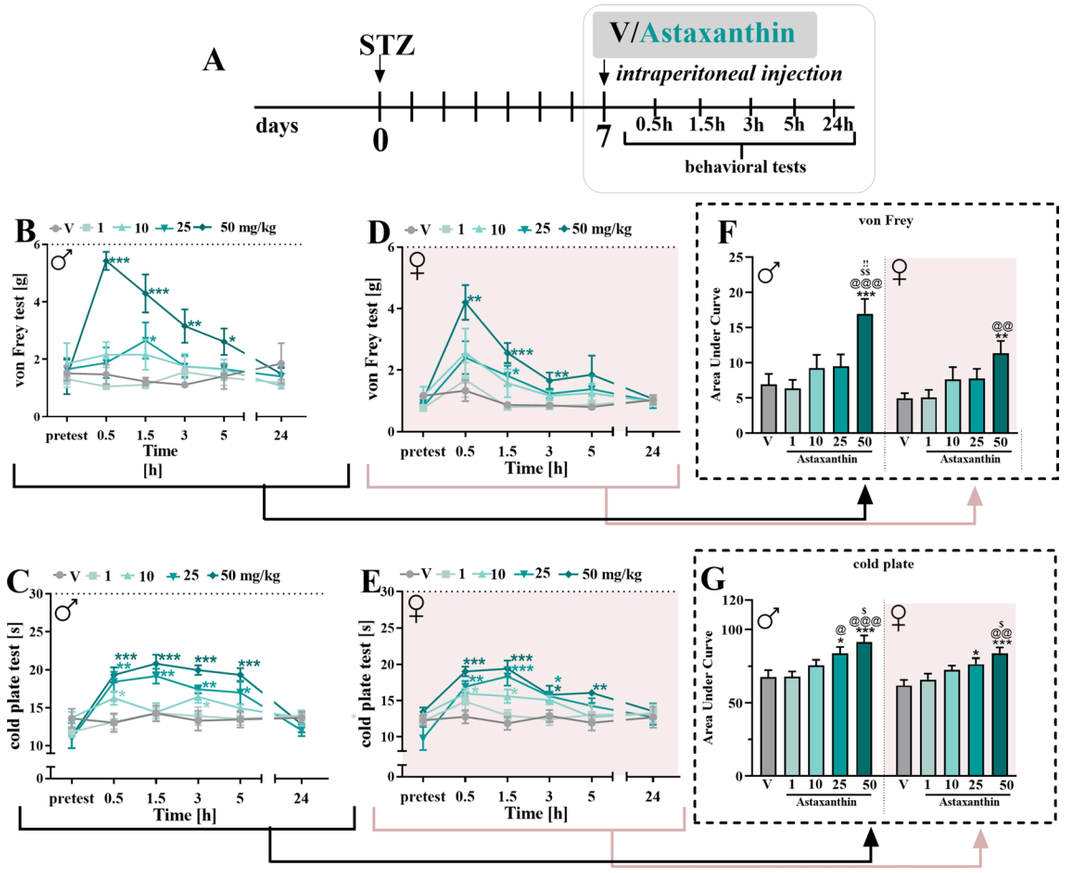


Fig. 2 Influence of *ip* astaxanthin administration on pain-related behavior in STZ-treated male and female mice **(A)**. The effects of injections of astaxanthin (1, 10, 25 and 50 mg/kg) on tactile and thermal hypersensitivity were assessed at 0.5, 1.5, 3, 5 and 24 h after treatment on the 7th day post-STZ in males (**B**, **C**) and females (**D**, **E**). The data are presented as the means ± SEMs and the numbers of animals are as follow: males: V = 7; 1 mg/kg = 7; 10 mg/kg = 7; 25 mg/kg = 6; 50 mg/kg = 7 and females: V = 6; 1 mg/kg = 6; 10 mg/kg = 6; 25 mg/kg = 6; 50 mg/kg = 7. Additionally, the results obtained from the von Frey (**B**,**D**) and cold plate (**C**,**E**) tests were analyzed as areas under the curve (**F**,**G**) to visualize overall changes between doses efficacy. The intergroup differences were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ indicate differences between V-treated STZ-exposed mice and substance-treated STZ-exposed mice; @ $p < 0.05$, @@ $p < 0.01$ and @@@ $p < 0.001$ indicate differences between animals treated with astaxanthin at the dose of 1 mg/kg; $ $p < 0.05$, $$ $p < 0.01$ indicate differences between animals treated with astaxanthin at the dose of 10 mg/kg; !! $p < 0.01$ indicates differences between animals treated with astaxanthin at the dose of 25 mg/kg 0.01. Moreover, treatment x time points interaction were measured using two-way repeated measures ANOVA. The dotted lines indicate the cutoff values for the tests

3 h ($F_{4,26}$=4.106; $p = 0.0104$) post-treatment in female mice (Fig. 2D). The dose of 25 mg/kg decreased mechanical hypersensitivity only 1.5 h after injection. The other doses did not cause a decrease in mechanical hypersensitivity at any time point after treatment. Two-way repeated measures ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the tested time points ($F_{20,156}$=1.799; $p = 0.0249$). Moreover, the analysis of the area under the curve revealed that each dose of astaxanthin after *ip* administration had a similar effect on hypersensitivity to mechanical stimuli in both male and female mice with diabetic neuropathic pain (Fig. 2F).

According to the cold plate test results, astaxanthin reduced thermal hypersensitivity in both sexes. In males, the best analgesic effects were observed at a dose of 50 mg/kg for 1.5 h ($F_{4,29}$=9.351; $p < 0.0001$); however, this dose was also effective at 0.5 h, 3 h and 5 h after administration (Fig. 2C). A dose of 25 mg/kg had analgesic effects at 0.5 h, 1.5 h and 3 h after administration, while a dose of 10 mg/kg reduced thermal hypersensitivity at 0.5 h and 3 h after treatment. A dose of 1 mg/kg did not influence thermal hypersensitivity in diabetic males. Two-way repeated measures ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the tested time points ($F_{20,174}$=3.623; $p < 0.0001$). Similarly, the most effective dose in females was 50 mg/kg, which significantly reduced thermal hypersensitivity 1.5 h ($F_{4,26}$=10.20; $p < 0.0001$) after administration; however, it was also effective at 0.5 h,

3 h and 5 h after treatment (Fig. 2E). A dose of 25 mg/kg had analgesic effects at 0.5 h, 1.5 h and 3 h after administration, while a dose of 10 mg/kg reduced thermal hypersensitivity at 0.5 and 1.5 h after treatment. The dose of 1 mg/kg did not have any effect. Two-way repeated measures ANOVA confirmed a significant interaction between the investigated treatment and the tested time points ($F_{20,156}$=2.208; p = 0.0037). Moreover, analysis of the area under the curve showed that after *ip* administration, astaxanthin had a similar effect on hypersensitivity to thermal stimuli in both male and female mice with diabetic neuropathic pain (Fig. 2G).

As specified by the calculated ED_{50} for *it* administration, the lowest value in the von Frey test was obtained for males; however, this difference was not statistically significant compared to that for females. In the case of the cold plate test, the effective *it* dose in both males and females was similar. According to *ip* administration, in both the von Frey and cold plate tests, lower ED_{50} values were calculated for males (Table 1), but these differences were not statistically significant compared with those for females. Due to the slightly better effect of astaxanthin after *ip* administration in males, experiments with repeated administration of this substance were carried out in this group, also bearing in mind that diabetic neuropathic pain develops faster in males.

The effect of repeated *ip* administration of astaxanthin on the analgesic effects of chronic treatment with morphine in STZ-exposed male mice

The influence of astaxanthin on pain-related behavior in male mice after treatment with STZ was evaluated by performing repeated injections of morphine (30 mg/kg *ip*) twice daily with or without astaxanthin (25 mg/kg, *ip*) for 17 days, starting from the 5th day after STZ administration (Figs. 3A and 4A). The results indicated that vehicle-treated STZ-treated mice exhibited mechanical and thermal hypersensitivity for 17 days. According to the von Frey test, morphine began to lose its analgesic potential beginning on the 5th day after administration, which resulted in the potentiation of tactile hypersensitivity on day 10 (Fig. 3B). Animals receiving astaxanthin showed a decrease in hypersensitivity to tactile stimuli throughout the experiment, remaining at a high level on day 17 ($F_{4,35}$=20.32; $p < 0.0001$). Interestingly, the combined administration of astaxanthin and morphine had an analgesic effect until day 7, after which the effect started to decrease. These results indicate that astaxanthin only slightly delayed the development of morphine tolerance in the von Frey test in mice with diabetic neuropathy. Moreover, two-way repeated measures ANOVA revealed significant interactions between treatment and all time points ($F_{52,501}$ = 2,371; $p < 0.0001$), in the response to tactile stimuli and additionally, between vehicle- and morphine-treated mice over a period of 10–17 days indicated that morphine caused even greater sensitivity ($F_{4,313}$=102.0; $p < 0.0001$), which confirmed the development of opioid-induced hyperalgesia (OIH). The comparison of this response between the mice receiving morphine and the animals treated with astaxanthin and morphine showed that astaxanthin prevented the development of OIH (p = 0.0002). Additionally, the analysis of the area under the curve of the von Frey test (Fig. 3C), calculated for two selected intervals (days 1–9 and days 10–17, when a greater sensitivity of animals receiving morphine was observed), also confirmed that morphine significantly lost its effectiveness over time (t = 3.969; p = 0.0041). The effectiveness of the administration of astaxanthin combined with morphine decreased between these intervals (t = 3.690; p = 0.0061). However, the analgesic effect of astaxanthin remained at a similar level in the von Frey test (Fig. 3C).

The cold plate test results revealed that morphine lost its analgesic potential on the 8th day after administration, and starting from the 13th day, it did not reduce hypersensitivity to thermal stimuli but even strengthened this reaction (Fig. 4B). Repeated administration of astaxanthin did not cause a decrease in hypersensitivity to thermal stimuli only between the 9th and 13th days of administration, while at the other investigated time points, an analgesic effect was observed. Interestingly, the combined administration of astaxanthin and morphine reduced thermal hypersensitivity until day 9, and this coadministration had better effects than morphine until the end of the experiment. These results indicate that astaxanthin slightly delay the development of morphine tolerance in the cold plate test in animals with diabetic neuropathy; however, it prevented OIH. This finding was also proved by two-way repeated measures ANOVA analysis of the animal's response to thermal stimuli over

Table 1 The ED_{50} values for the effects of *it* (0.5, 2, 4 µg/5 µl) and *ip* (1, 10, or 50 mg/kg) astaxanthin administered to male and female mice were calculated, with 95% confidence intervals for STZ-exposed mice as measured by Von Frey and cold plate tests 1.5 h after drug injection

ASTAXANTHIN			
ROUTE OF ADMINISTRATION	BEHAVIORAL TESTS	ED_{50}	
		♂	♀
it	von Frey	1.23 (0.51–2.96)	3.01 (0.33–27.73)
	cold plate	1.48 (0.42–5.14)	1.16 (0.22–6.06)
ip	von Frey	20.01 (2.05-195.68)	106.52 (9.50-1194.80)
	cold plate	3.87 (0.36–41.60)	6.53 (0.93–45.97)

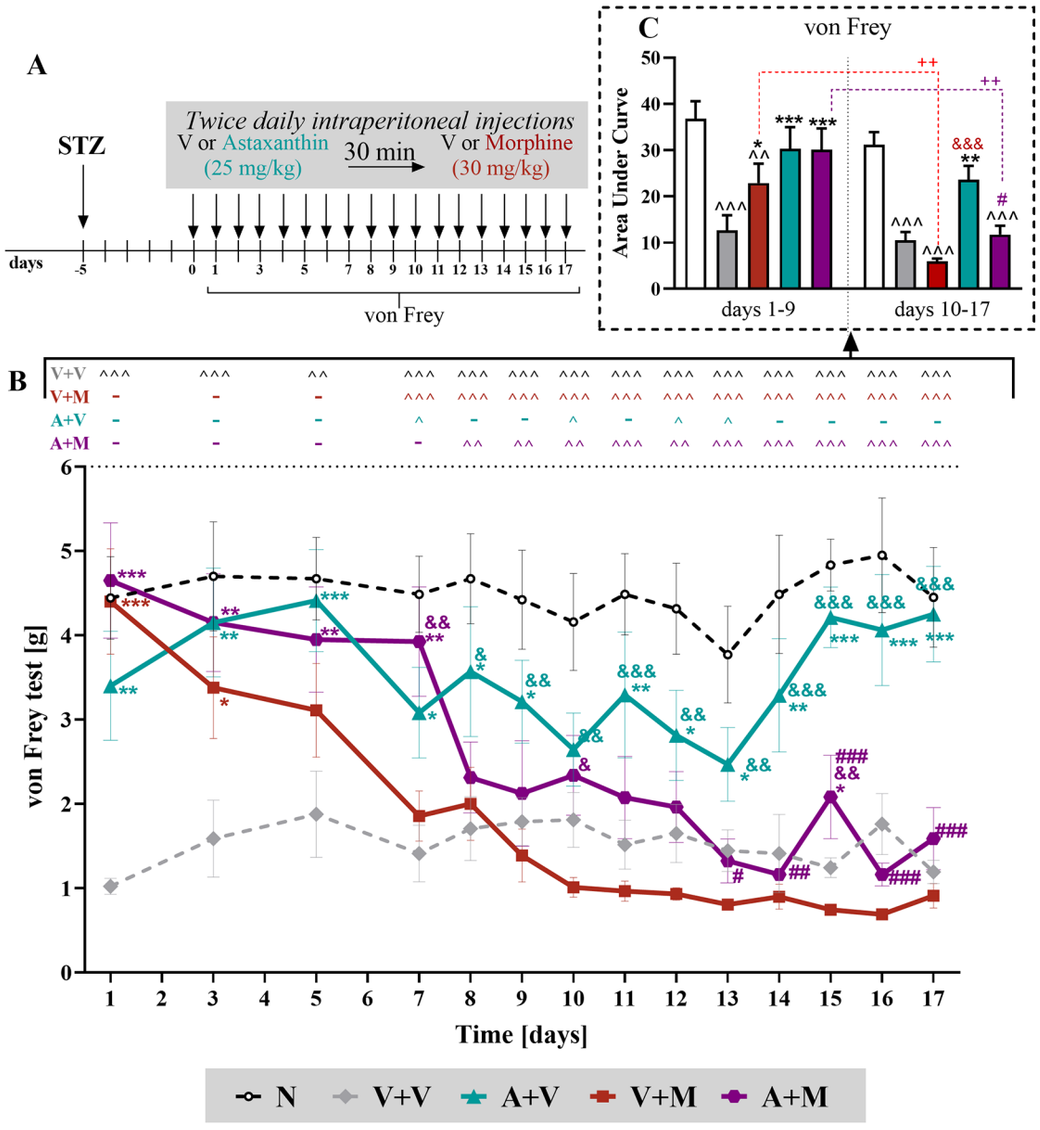


Fig. 3 Repeated twice daily *ip* administration of astaxanthin (25 mg/kg) influenced morphine (30 mg/kg) tolerance as measured by von Frey in male mice (**A**). V and astaxanthin (25 mg/kg) were repeatedly administered on the 5th day after STZ injection and then twice daily for 17 days, 30 min before treatment with V or morphine (M, 30 mg/kg); 30 min later, the von Frey **(B)** tests were conducted. The data are presented as the mean ± SEM, and the numbers of animals are as follows: $N = 6–7$; V + V = 9; V + M = 9; A + V = 8; A + M = 8. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test. Additionally, the data obtained from the von Frey **(B)** test were analyzed as areas under the curve **(C)** in late and early phase of experiment to visualize overall changes between doses efficacy. ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^^ $p < 0.001$ indicate differences between naive and STZ-exposed mice; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ indicate differences compared with V + V-treated STZ-exposed mice; & $p < 0.05$, && $p < 0.01$ and &&& $p < 0.001$ indicate differences compared with the V + M-treated STZ-exposed mice; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ indicate differences compared to the A + V-treated STZ-exposed mice. Furthermore, the t test was used to compare the two time intervals from AUC analysis (**C**) and ++ $p < 0.01$ indicates differences between the respective groups. Moreover, treatment x time points interaction were measured using two-way repeated measures ANOVA. The dotted lines show the cutoff values for the tests. Abbreviations: A, astaxanthin; M, morphine; N, naive; V, vehicle; STZ, streptozotocin

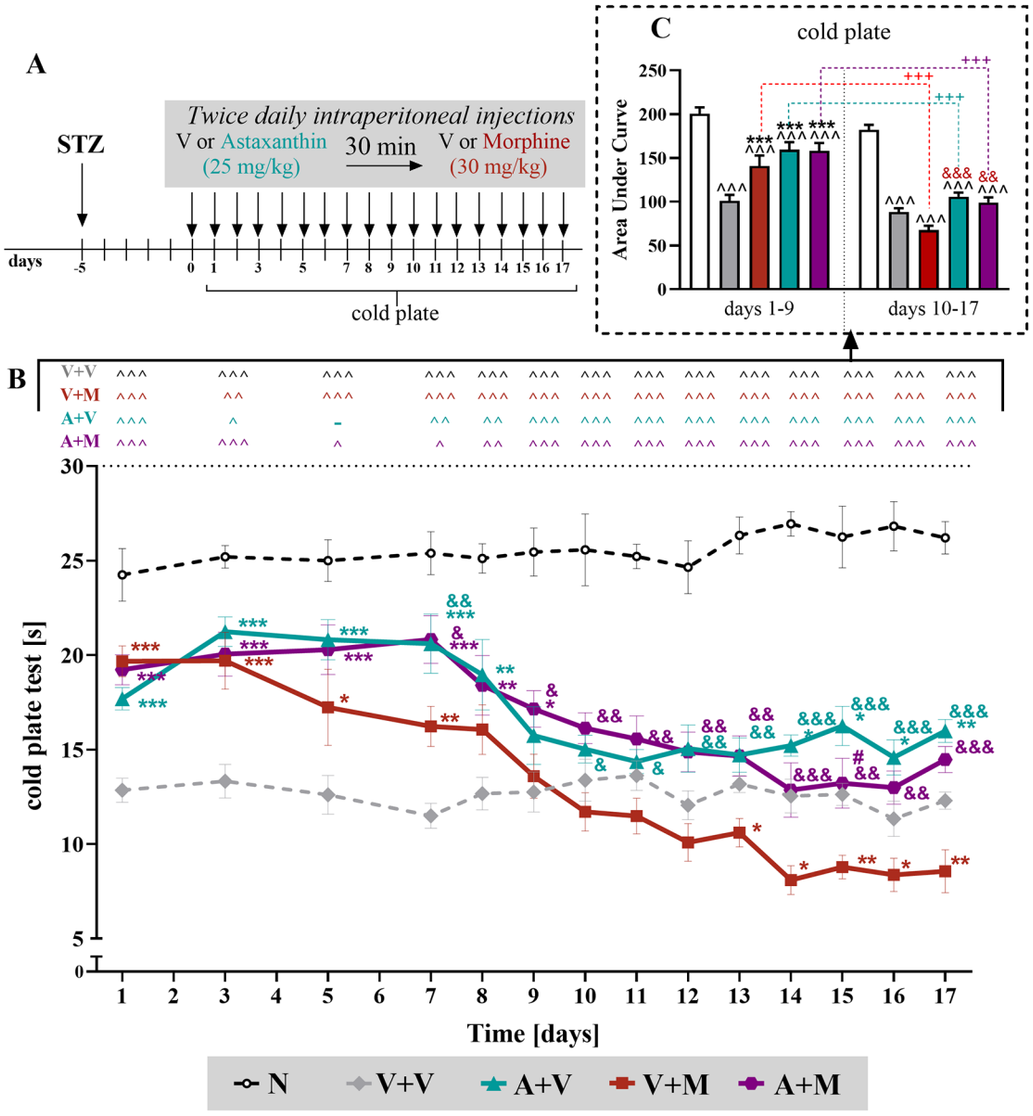


Fig. 4 Repeated twice daily *ip* administration of astaxanthin (25 mg/kg) influenced morphine (30 mg/kg) tolerance and opioid-induced hyperalgesia, as measured by cold plate in male mice **(A)**. V and astaxanthin (25 mg/kg) were repeatedly administered on the 5th day after STZ injection and then twice daily for 17 days, 30 min before treatment with V or morphine (M, 30 mg/kg); 35 min later cold plate (**B**) tests were conducted. The data are presented as the mean ± SEM, and the numbers of animals are as follows: $N = 6–7$; V + V = 9; V + M = 9; A + V = 8; A + M = 8. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test. Additionally, the data obtained from the cold plate **(B)** test were analyzed as areas under the curve **(C)**, in late and early phase of experiment to visualize overall changes between doses efficacy. ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^^ $p < 0.001$ indicate differences between naive and STZ-exposed mice; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ indicate differences compared with V + V-treated STZ-exposed mice; & $p < 0.05$, && $p < 0.01$ and &&& $p < 0.001$ indicate differences compared with the V + M-treated STZ-exposed mice; # $p < 0.05$, indicates differences compared to the A + V-treated STZ-exposed mice. Furthermore, the t test was used to compare the two time intervals from AUC analysis (**C**) and +++ $p < 0.01$ indicates differences between the respective groups. Moreover, treatment x time points interaction were measured using two-way repeated measures ANOVA. The dotted lines show the cutoff values for the tests. Abbreviations: A, astaxanthin; M, morphine; N, naive; V, vehicle; STZ, streptozotocin

a period of 10–17 days, which indicated that morphine caused even greater sensitivity ($F_{4,313}$=291.7; $p<0.0001$), which confirmed the development of OIH. We also noted a decrease in hypersensitivity in mice treated with astaxanthin and morphine in comparison to that in mice treated with morphine alone ($p<0.0001$). However, significant interaction between treatment and all time points were confirmed using two-way repeated measures ANOVA ($F_{52,\ 501}$ = 3,884). Calculation of the area under the curve for the cold plate test also confirmed that morphine lost its effectiveness (t = 5.647; $p=0.0005$), but this effect was observed as well for astaxanthin (t = 5.493; $p=0.0006$) and for their coadministration (t = 5.435; $p=0.0006$) (Fig. 4C).

The influence of repeated *ip* administration of astaxanthin and morphine on motor coordination, blood glucose levels and body weight in STZ-treated male mice

The effect of astaxanthin and morphine on motor coordination in STZ-treated mice was evaluated on days 9 and 17 as a part of the repeated administration study (Fig. 5A). In both this time points the analgesic effects of astaxanthin were observed, however morphine had already lost its effectiveness (Fig. 3B, C). Importantly, the obtained results showed that there was no significant differences in locomotor function among the tested groups (Fig. 5B). On the same days, glycemia and body weight were also measured. All STZ-treated groups of mice had elevated blood glucose levels in comparison to those of naive animals, which was noted at each time point (Fig. 5C). In the case of body weight measurements, animals treated with STZ weighed less than naive mice (Fig. 5D).

Discussion

The experiments performed in the following behavioral study are the first to demonstrate that in a diabetic neuropathic pain model, both the *it* and *ip* administration of astaxanthin diminishes tactile and thermal hypersensitivity. Moreover, astaxanthin, regardless of the route of administration, exerts analgesic effects in a similar way in male and female mice. These results also provide evidence that systemic, repeated administration of astaxanthin slightly delays the development of morphine tolerance but significantly suppresses the occurrence of OIH, although it does not affect blood glucose levels, body weight or motor coordination. Unexpectedly, astaxanthin administered repeatedly produced a better analgesic effect when administered alone than when it was administered in combination with morphine, as was noted particularly in the von Frey test, and

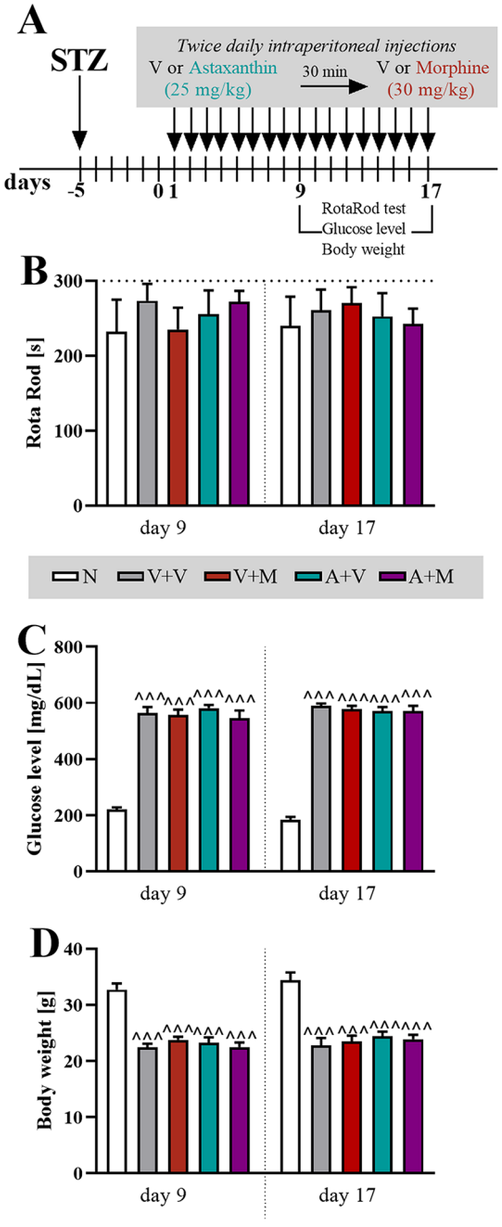


Fig. 5 The effects of repeated *ip* administration of astaxanthin (25 mg/kg) or morphine (30 mg/kg) and their coadministration on motor coordination, blood glucose levels and body weight in STZ-treated male mice (**A**). This evaluation was performed on Days 9 and 17 as part of the repeated administration study. The rotarod test was conducted 1 h after the morphine administration (**B**), and glucose level (**C**) and body weight (**D**) measurements were also performed and the numbers of animals are as follows: $N=7$; V + V = 9; V + M = 9; A + V = 8; A + M = 8. The results were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test. ^^^ $p<0.001$ indicates differences between naive and STZ-exposed mice. The dotted lines indicate the cutoff values for the rotarod test. Abbreviations: A, astaxanthin; M, morphine; N, naive; V, vehicle; STZ, streptozotocin

its potency became even more pronounced over time. These results provide a basis for further evaluation of the potential use of astaxanthin in the clinical treatment of diabetic neuropathy and suggest that the multidirectional action of this substance may have positive effects on relieving pain.

This study was performed in a well-established animal model of diabetic neuropathy induced by a single *ip* injection of STZ. The first symptoms of pain appear around day 3, and hypersensitivity is most severe starting on day 6 in both sexes and remains at this level for several weeks [6, 7, 61–66]. In this model, as well as in patients suffering from diabetes, neuropathy develops in sensory and motor nerves [67–69]. In STZ-induced diabetes, increased glucose concentrations in the blood correlate with tactile and thermal hypersensitivity development [27], which is consistent with our results.

In recent years, clinical [70] and experimental [6, 27, 66, 71] research has indicated that the treatment of diabetic neuropathy remains challenging due to the complicated molecular mechanisms. Several studies, including ours, have suggested that MAPKs are involved in hypersensitivity [25–27, 31, 72]. Importantly, the influence of glucolipotoxicity on apoptotic p38 and JNK1/2 signaling has already been proven [73]. Moreover, high glucose levels through ERK1/2 signaling promote defects in insulin secretion [74–77]. It was also reported that in diabetic C57BL/KsJ-db/db mice, astaxanthin exerts beneficial effects by promoting the ability of islet cells to secrete insulin, which results in lower levels of blood glucose [78]. However, the Bhattarai group showed that in STZ-induced diabetic mice, astaxanthin does not directly improve hyperglycemia despite its long-term administration [79]. Similar results were also obtained in STZ-induced diabetic rats, where astaxanthin had no significant effect on blood glucose levels but inhibited oxidative stress and inflammatory mediators in ocular tissues [80]. In agreement with these reports, in our study, we did not observe an influence of astaxanthin on blood glucose levels at any studied time point. However, our research demonstrated that astaxanthin effectively reduced STZ-induced neuropathic pain symptoms. This observation leads to the consideration of which mechanisms of action of this substance may be involved in these beneficial effects. Astaxanthin (3,3′-dihydroxy-β, β′-carotene-4,4′-dione; molecular formula $C_{40}H_{52}O_4$) has been previously reported to have therapeutic antidiabetic, anti-inflammatory, and neuroprotective effects [81]. It is a substance widely found in microalgae, yeast, bacteria and plants, and its chemical and safety profile is well-described [82]. The great advantage of this compound is the fact that thanks to its unique molecular structure, astaxanthin easily crosses the blood–brain barrier [83]. The *ip* administration of astaxanthin relieves neuropathic pain by inhibiting ERK1/2 and p38 activation after spinal nerve ligation in mice [36]. ERK1/2 signaling is linked to potassium channel phosphorylation and changes in voltage-gated calcium channels in sensory neurons [84]. A series of pharmacological studies have shown that selective inhibitors of ERK1/2 (U0126, PD98059, PD198306) [23, 31, 85–87], p38 (SB203580, FR167653) [20, 88–90] and JNK (D-JNKI-1JNK, SP600125) [91, 92] reduce hypersensitivity in different neuropathic pain models. Notably, the first tests were undertaken to evaluate the analgesic potency of the p38 inhibitors (SB-681323, GW856553) in patients suffering from neuropathic pain [93, 94]; however, further evaluation in larger clinical trials is needed. Nevertheless, since p38, ERK1/2 and JNK1/2 inhibitors have been shown to induce pain relief in neuropathic pain models, we assumed that substances acting on the entire MAPK family could be even more effective. One such drug is minocycline, which, in addition to being a p38 inhibitor, also impairs ERK1/2 and JNK signaling [95, 96]. Since astaxanthin is also considered to be a MAPKs inhibitor [33–36], we suspect that these mechanisms, among others, might be responsible for the reduction in hypersensitivity in the mice in our experiments.

Importantly, in 2023, we showed that *it* administration of astaxanthin significantly diminished hypersensitivity in male mice exposed to sciatic nerve injury, and a single administration of morphine evoked better analgesic effects than either of these drugs alone [37]. In the present study, we showed that both *it* and *ip* administration of astaxanthin relieve pain in a STZ-induced neuropathic pain model and, importantly, to a similar extent in both males and females. Additionally, in our opinion, the beneficial effects of astaxanthin are probably not only due to the inhibition of the MAPK family, but also to the fact that this substance is an activator of Nrf2 [97]. Recently, it was shown that Nrf2 is involved in relieving neuropathic pain by reducing neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in rodent models [98–100]. Moreover, in 2023, we showed that bardoxolone methyl (Nrf2 activator [101, 102]) diminished tactile and thermal hypersensitivity and enhanced opioid effectiveness in mice exposed to sciatic nerve injury [37]. These data correspond well with the results of other studies, which also revealed the beneficial effects of bardoxolone methyl in ischemic optic [103] and diabetic [104] neuropathy. In summary, we have shown for the first time that a single, systemic administration of astaxanthin has beneficial effects in an STZ-induced diabetic neuropathic pain model in male and female mice. Taking into account the previous studies [82], the doses of astaxanthin we used are non-toxic, and the observations of the mice and behavioral tests revealed no visible adverse effects of astaxanthin, including no impact on the animals' motor coordination. It should be emphasized that previous research indicate several mechanisms of

action of astaxanthin in pain, however, in order to assess whether a peripheral or central mechanisms are responsible for analgesic effect of this substance, more detailed biochemical studies are necessary.

Despite the fact that multiple guidelines for the treatment of diabetic neuropathic pain are available, many drugs do not provide satisfactory pain relief and have side effects that limit their usefulness. It is well known that neuropathic pain and opioid tolerance share common features of the loss of analgesic efficacy of these drugs, which suggests that similar mechanisms are involved in these processes [72, 105–109]. However, further experiments, including pharmacological studies, are needed to explain the cause of the decrease in the effectiveness of morphine in treating neuropathic pain. Some studies indicate that one of the reasons may be highly activated MAPK signaling. Our group reported that repeated systemic administration of minocycline reduced the development of morphine tolerance in a nerve injury-evoked neuropathic pain model [72] because of its ability to inhibit spinal p38 activation, as shown by others [110]. Since then, there has been increasing evidence that MAPKs contribute to the decreased effectiveness of opioids in neuropathy. Moreover, it has recently been demonstrated that Nrf2 activators, such as 5-fluoro-2-oxindole [111] and sulforaphane [112] also enhance morphine analgesia. Therefore, bearing in mind that the inhibition of p38 [108], ERK1/2 [23, 31] and JNK [113, 114] or activation of Nrf2 [111, 112] improves morphine analgesia in neuropathic pain models [27, 108], astaxanthin seemed to be a promising substance, due to its pleiotropic mechanism of action which include modulation of above-mentioned factors. In the current experiments we observed that up to day 7 administration of astaxanthin with morphine evokes pain relief, however in this group we also reported the development of morphine tolerance in both behavioral tests, but importantly astaxanthin prevents the occurrence of OIH, phenomenon which is well described in the literature [115, 116]. This is a state of hypersensitivity to painful stimuli resulting in the exacerbation of a pain sensation [115]. The long-term use of morphine leads to adaptations within downstream signaling pathways of opioid receptors. In tolerance, continued β-arrestin binding to the receptor leads to internalization, degradation, and a decreased number of membrane receptors, while in OIH, the role of factors responsible for reducing antinociceptive systems and amplifying pronociceptive signals has been implicated [116]. Additionally, one of the mechanisms reported to be responsible for the occurrence of OIH is increased activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, which causes spinal neuron sensitization. It has been reported that the NMDA receptor antagonist MK801 ameliorates opioid-associated hyperalgesia [117, 118]. Recently, molecular docking studies have shown that astaxanthin fits into the inhibitory binding pocket of the NMDA receptor, and it was also reported that this substance beneficially regulates ionotropic glutamate receptors, which prevents excitotoxicity [39, 119]. The results of our experiments clearly indicate that astaxanthin prevents the development of OIH, which may also be related to these effects on NMDA receptors. Unexpectedly, astaxanthin administered alone has better analgesic effects than morphine and it does not lose its effects over time in terms of relieving tactile hypersensitivity. Therefore, it seems that this compound probably has a greater impact on nociceptive transmission through the Aβ fibers responsible for touch than through the C fibers, which conduct thermal stimuli [120]. It was previously showed that in diabetic neuropathic pain model the mechanical hypersensitivity in rats was reversed by acute and repeated administration of p38 inhibitor (SD-282), but this substance prevented the exacerbation of C-, but not Aδ mediated thermal hypersensitivity [121]. However in case of our experiments it needs to be explained in future studies if astaxanthin indeed affects fibers differently. In sum, our results provide a basis for further evaluation of the potential use of astaxanthin in the clinical treatment of diabetic neuropathy alone and as a part of combined therapy.

Summary

Considering that naturally derived products with pharmacological effects are of great interest to the medical industry in the 21st century, the use of astaxanthin, which has multiple mechanisms of action, may be an important pharmacological tool for the treatment of neuropathic pain, which is a serious and common complication of diabetes. In light of our current behavioral results obtained in a mouse model, we can only hypothesize that inhibition of MAPK signaling, activation of Nrf2 and/or blockade of NMDA receptors play a role in astaxanthin-induced analgesia in diabetic neuropathy. Undoubtedly, further long-term behavioral and molecular studies are needed to explain the neuroimmune background of analgesic action of astaxanthin in diabetes in female and male mice. Nevertheless, taking into account the already known multidirectional mechanism of action of this substance, explaining its long-term analgesia in diabetic neuropathy requires the use of specialized methods with a broad spectrum of analysis. From a clinical point of view, it is worth emphasizing that in our experiments, we noticed not only a reduction in thermal and

tactile hypersensitivity but also no side effects in the animals treated with astaxanthin. Moreover, astaxanthin is already used and approved as a dietary supplement, safe for human consumption [122]. Overall, these promising results are important for the development of new, more effective therapeutic interventions; however, continuation of this research is essential to broaden our knowledge regarding the mechanisms of diabetic neuropathy.

Acknowledgements Acknowledgments: The English language was edited by American Journal Experts (certificate no A2F7-1506-D6B4-1335-9C89).

Author contributions K.C. Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Validation; Visualization; Writing - original draft; Writing - review & editing; K.P. Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing - original draft; Writing - review & editing; A.C. Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing - original draft; Writing - review & editing; W.M. Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing - original draft; Writing - review & editing; J.M. Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Project administration; Supervision; Visualization; Writing - original draft; Writing - review & editing. All authors contributed to and have approved the final version of the manuscript.

Funding This research was funded by grants from the National Science Centre, Poland, OPUS 22 2021/43/B/NZ7/00230, and statutory funds from the Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences.

Data availability No datasets were generated or analysed during the current study.

Declarations

Ethical approval All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed. The number of animals was limited to the necessary minimum. The experiments were carried out according to the recommendations and standards of the International Association for the Study of Pain and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Ethical Committee of the Maj Institute of Pharmacology of the Polish Academy of Sciences (permission numbers: LKE 252/2023; 128/2023; 124/2024).

Competing interests The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

References

1. Zhou B. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. Lancet (London England). 2016;387:1513–30. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00618-8.
2. Feldman EL, Nave K-A, Jensen TS, Bennett DLH. New Horizons in Diabetic Neuropathy: mechanisms, Bioenergetics, and Pain. Neuron. 2017;93:1296–313. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.005.
3. Balhara YPS, Singh S, Kalra S. Pragmatic opioid use in painful diabetic neuropathy. Eur Endocrinol. 2020;16:21–4. https://doi.org/10.17925/EE.2020.16.1.21.
4. Zychowska M, Rojewska E, Przewlocka B, Mika J. Mechanisms and pharmacology of diabetic neuropathy - experimental and clinical studies. Pharmacol Rep. 2013;65. https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71521-4.
5. Pop-Busui R, Ang L, Holmes C, Gallagher K, Feldman EL. Inflammation as a therapeutic target for Diabetic neuropathies. Curr Diab Rep. 2016;16:29. https://doi.org/10.1007/s11892-016-0727-5.
6. Rojewska E, Zychowska M, Piotrowska A, Kreiner G, Nalepa I, Mika J. Involvement of macrophage inflammatory Protein-1 family members in the development of Diabetic Neuropathy and their contribution to effectiveness of Morphine. Front Immunol. 2018;9. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00494.
7. Zychowska M, Rojewska E, Pilat D, Mika J. The role of some chemokines from the CXC Subfamily in a mouse model of Diabetic Neuropathy. J Diabetes Res. 2015;2015:1–13. https://doi.org/10.1155/2015/750182.
8. Calcutt NA. Diabetic neuropathy and neuropathic pain: a (con) fusion of pathogenic mechanisms? Pain 2020;161:S65–86. https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001922
9. Abraham A, Barnett C, Katzberg HD, Lovblom LE, Perkins BA, Bril V. Sex differences in neuropathic pain intensity in diabetes. J Neurol Sci. 2018;388:103–6. https://doi.org/10.1016/J.JNS.2018.03.008.
10. Aaberg ML, Burch DM, Hud ZR, Zacharias MP. Gender differences in the onset of diabetic neuropathy. J Diabetes Complications. 2008;22:83–7. https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2007.06.009.
11. Parisi MCR, Neto AM, Menezes FH, Gomes MB, Teixeira RM, De Oliveira JEP, et al. Baseline characteristics and risk factors for ulcer, amputation and severe neuropathy in diabetic foot at risk: the BRAZUPA study. Diabetol Metab Syndr. 2016;8. https://doi.org/10.1186/S13098-016-0126-8.
12. Elliott J, Sloan G, Stevens L, Selvarajah D, Cruccu G, Gandhi RA, et al. Female sex is a risk factor for painful diabetic peripheral neuropathy: the EURODIAB prospective diabetes complications study. Diabetologia. 2024;67:190–8. https://doi.org/10.1007/S00125-023-06025-Z.
13. Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B. Importance of glial activation in neuropathic pain. Eur J Pharmacol. 2013;716:106–19. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.072.
14. Tsuda M. Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. J Diabetes Investig. 2016;7:17–26. https://doi.org/10.1111/jdi.12379.
15. Inoue K, Tsuda M. Microglia and neuropathic pain. Glia. 2009;57:1469–79. https://doi.org/10.1002/glia.20871.
16. Popiolek-Barczyk K, Mika J. Targeting the Microglial Signaling pathways: New insights in the Modulation of Neuropathic Pain. Curr Med Chem. 2016;23:2908–28. https://doi.org/10.2174/0929867323666160607120124.

17. Ji RR, Suter MR. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. Mol Pain. 2007;3:1744. 8069-3–33.
18. Ji R-R, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. Brain Res Rev. 2009;60:135–48. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.011.
19. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Sci (80-). 2002;298:1911–2. https://doi.org/10.1126/science.1072682.
20. Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji RR. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. J Neurosci. 2003;23:4017–22. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-10-04017.2003.
21. Obata K, Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. Life Sci. 2004;74:2643–53. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.01.007.
22. Ma W, Quirion R. The ERK/MAPK pathway, as a target for the treatment of neuropathic pain. Expert Opin Ther Targets. 2005;9:699–713. https://doi.org/10.1517/14728222.9.4.699.
23. Popiolek-Barczyk K, Makuch W, Rojewska E, Pilat D, Mika J. Inhibition of intracellular signaling pathways NF-κB and MEK1/2 attenuates neuropathic pain development and enhances morphine analgesia. Pharmacol Rep. 2014;66:845–51. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.05.001.
24. Qu Y-J, Jia L, Zhang X, Wei H, Yue S-W. MAPK pathways are involved in Neuropathic Pain in rats with Chronic Compression of the dorsal Root Ganglion. Evidence-Based Complement Altern Med. 2016;2016:1–8. https://doi.org/10.1155/2016/6153215.
25. Mika J, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Makuch W, Starowicz K, Przewlocka B. Delta-Opioid receptor analgesia is Independent of Microglial activation in a rat model of Neuropathic Pain. PLoS ONE. 2014;9:e104420. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104420.
26. Mika J, Osikowicz M, Makuch W, Przewlocka B. Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. Eur J Pharmacol. 2007;560:142–9. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.01.013.
27. Zychowska M, Rojewska E, Kreiner G, Nalepa I, Przewlocka B, Mika J. Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. J Neuroimmunol. 2013;262:35–45. https://doi.org/10.1016/J.JNEUROIM.2013.06.005.
28. Deng M, Chen S, Chen H, Luo Y, Dong Y, Pan H. Mitogen-activated protein kinase signaling mediates opioid-induced presynaptic NMDA receptor activation and analgesic tolerance. J Neurochem. 2019;148:275–90. https://doi.org/10.1111/jnc.14628.
29. Tian Y, Liu M, Mao-Ying Q-L, Liu H, Wang Z-F, Zhang M-T, et al. Early single aspirin-triggered Lipoxin blocked morphine antinociception tolerance through inhibiting NALP1 inflammasome: involvement of PI3k/Akt signaling pathway. Brain Behav Immun. 2015;50:63–77. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.06.016.
30. Gao YJ, Cheng JK, Zeng Q, Xu ZZ, Decosterd I, Xu X, et al. Selective inhibition of JNK with a peptide inhibitor attenuates pain hypersensitivity and tumor growth in a mouse skin cancer pain model. Exp Neurol. 2009;219:146–55. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.05.006.
31. Rojewska E, Popiolek-Barczyk K, Kolosowska N, Piotrowska A, Zychowska M, Makuch W, et al. PD98059 influences Immune factors and enhances opioid Analgesia in Model of Neuropathy. PLoS ONE. 2015;10:e0138583. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138583.
32. Zhou Y-Q, Mei W, Tian X-B, Tian Y-K, Liu D-Q, Ye D-W. The therapeutic potential of Nrf2 inducers in chronic pain: evidence from preclinical studies. Pharmacol Ther. 2021;225:107846. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107846.
33. Li Y, Wang Q, Chu C, Liu S. Astaxanthin protects retinal ganglion cells from acute glaucoma via the Nrf2/HO-1 pathway. J Chem Neuroanat. 2020;110:101876. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101876.
34. Heidari Khoei H, Fakhri S, Parvardeh S, Shams Mofarahe Z, Baninameh Z, Vardiani M. Astaxanthin prevents the methotrexate-induced reproductive toxicity by targeting oxidative stress in male mice. Toxin Rev. 2019;38:248–54. https://doi.org/10.1080/15569543.2018.1452263.
35. Eslami M, Esfandyari S, Aghahosseini M, Rashidi Z, Hosseinishental S, Brenjian S, et al. Astaxanthin protects human granulosa cells against oxidative stress through activation of NRF2/ARE pathway and its downstream phase II enzymes. Cell J. 2021;23:319–28. https://doi.org/10.22074/cellj.2021.7222.
36. Zhao L, Tao X, Song T. Astaxanthin alleviates neuropathic pain by inhibiting the MAPKs and NF-κB pathways. Eur J Pharmacol. 2021;912:174575. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174575.
37. Ciapała K, Rojewska E, Pawlik K, Ciechanowska A, Mika J. Analgesic effects of Fisetin, Peimine, Astaxanthin, Artemisinin, Bardoxolone Methyl and 740 Y-P and their influence on opioid analgesia in a mouse model of Neuropathic Pain. Int J Mol Sci. 2023;24. https://doi.org/10.3390/IJMS24109000.
38. Zhou HY, Chen SR, Pan HL. Targeting N-methyl-D-aspartate receptors for treatment of neuropathic pain. Expert Rev Clin Pharmacol. 2011;4:379. https://doi.org/10.1586/ECP.11.17.
39. Sharma K, Sharma D, Sharma M, Sharma N, Bidve P, Prajapati N, et al. Astaxanthin ameliorates behavioral and biochemical alterations in in-vitro and in-vivo model of neuropathic pain. Neurosci Lett. 2018;674:162–70. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.03.030.
40. Kishimoto Y, Yoshida H, Kondo K. Potential Anti-atherosclerotic properties of Astaxanthin. Mar Drugs. 2016;14. https://doi.org/10.3390/MD14020035.
41. Ciapała K, Mika J. Advances in neuropathic Pain Research: selected intracellular factors as potential targets for multidirectional analgesics. Pharmaceuticals (Basel). 2023;16. https://doi.org/10.3390/PH16111624.
42. Kadanangode Narayanaswam N, Caston E, Satish Kumar RC, Vijayakumar TM, Vanangamudi VS, Pankaj N, et al. A randomized interventional clinical trial assessing the safety and effectiveness of PeaNoc XL tablets in managing joint pain and inflammation in arthritis patients. F1000Research. 2023;12:895. https://doi.org/10.12688/f1000research.138477.1.
43. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. vol. 16. 1983.
44. Dogrul A, Gul H, Yesilyurt O, Ulas UH, Yildiz O. Systemic and spinal administration of etanercept, a tumor necrosis factor alpha inhibitor, blocks tactile allodynia in diabetic mice. Acta Diabetol. 2011;48:135–42. https://doi.org/10.1007/s00592-010-0237-x.
45. Murakami T, Iwanaga T, Ogawa Y, Fujita Y, Sato E, Yoshitomi H, et al. Development of sensory neuropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. Brain Behav. 2013;3:35–41. https://doi.org/10.1002/brb3.111.
46. Kamei J, Ohhashi Y, Aoki T, Kasuya Y. Streptozotocin-induced diabetes in mice reduces the nociceptive threshold, as recognized after application of noxious mechanical stimuli but not of thermal stimuli. Pharmacol Biochem Behav. 1991;39:541–4. https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90224-P.
47. Ohsawa M, Aasato M, Hayashi S-S, Kamei J. RhoA/Rho kinase pathway contributes to the pathogenesis of thermal hyperalgesia in diabetic mice. Pain. 2011;152:114–22. https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.10.005.

48. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 2008;51:216–26. https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7.
49. Bishnoi M, Bosgraaf CA, Abooj U, Zhong L, Premkumar LS. Streptozotocin-Induced Early Thermal Hyperalgesia is independent of glycemic state of rats: role of transient receptor potential vanilloid 1(TRPV1) and inflammatory mediators. Mol Pain. 2011;7:1744–8069. -7–52.
50. Kwiatkowski K, Popiolek-Barczyk K, Piotrowska A, Rojewska E, Ciapała K, Makuch W, et al. Chemokines CCL2 and CCL7, but not CCL12, play a significant role in the development of pain-related behavior and opioid-induced analgesia. Cytokine. 2019;119:202–13. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.03.007.
51. Fairbanks CA. Spinal delivery of analgesics in experimental models of pain and analgesia. Adv Drug Deliv Rev. 2003;55:1007–41. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(03)00101-7.
52. Zhang H, Yang W, Li Y, Hu L, Dai Y, Chen J, et al. Astaxanthin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. Int Immunopharmacol. 2018;56:18–28. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.011.
53. Zhao Y-L, Chen S-R, Chen H, Pan H-L. Chronic opioid potentiates presynaptic but impairs postsynaptic N-Methyl-d-aspartic acid receptor activity in spinal cords. J Biol Chem. 2012;287:25073–85. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.378737.
54. Jin D, Chen H, Zhou MH, Chen SR, Pan HL. mGluR5 from primary sensory neurons promotes opioid-Induced Hyperalgesia and Tolerance by interacting with and potentiating synaptic NMDA receptors. J Neurosci. 2023;43:5593. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0601-23.2023.
55. Rojewska E, Ciapała K, Mika J. Kynurenic acid and zaprinast diminished CXCL17-evoked pain-related behaviour and enhanced morphine analgesia in a mouse neuropathic pain model. Pharmacol Rep. 2019;71:139–48. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.10.002.
56. Piotrowska A, Ciapała K, Pawlik K, Kwiatkowski K, Rojewska E, Mika J. Comparison of the effects of Chemokine receptors CXCR2 and CXCR3 pharmacological modulation in Neuropathic Pain Model—In vivo and in Vitro Study. Int J Mol Sci. 2021;22:11074. https://doi.org/10.3390/ijms222011074.
57. Kwiatkowski K, Ciapała K, Rojewska E, Makuch W, Mika J. Comparison of the beneficial effects of RS504393, maraviroc and cenicriviroc on neuropathic pain-related symptoms in rodents: behavioral and biochemical analyses. Int Immunopharmacol. 2020;84:106540. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106540.
58. Pawlik K, Ciechanowska A, Ciapała K, Rojewska E, Makuch W, Mika J. Blockade of CC Chemokine Receptor Type 3 diminishes Pain and enhances opioid analgesic potency in a Model of Neuropathic Pain. Front Immunol. 2021;12. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.781310.
59. Starnowska J, Costante R, Guillemyn K, Popiolek-Barczyk K, Chung NN, Lemieux C, et al. Analgesic properties of Opioid/NK1 Multitarget ligands with distinct in Vitro profiles in Naive and Chronic Constriction Injury mice. ACS Chem Neurosci. 2017;8:2315–24. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00226.
60. Hill ID, Tallarida RJ, Murray RB. Manual of pharmacologic calculations with Computer Programs. J R Stat Soc Ser C. 1982;31:307–8. https://doi.org/10.2307/2348009.
61. Castany S, Carcolé M, Leánez S, Pol O. The antinociceptive effects of a δ-opioid receptor agonist in mice with painful diabetic neuropathy: involvement of heme oxygenase 1. Neurosci Lett. 2016;614:49–54. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.059.
62. Kou Z-Z, Wan F-P, Bai Y, Li C-Y, Hu J-C, Zhang G-T, et al. Decreased Endomorphin-2 and μ-Opioid receptor in the Spinal Cord Are Associated with painful Diabetic Neuropathy. Front Mol Neurosci. 2016;9. https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00080.
63. Morgado C, Pereira-Terra P, Cruz CD, Tavares I. Minocycline completely reverses mechanical hyperalgesia in diabetic rats through microglia-induced changes in the expression of the potassium chloride co-transporter 2 (KCC2) at the spinal cord. Diabetes Obes Metab. 2011;13:150–9. https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01333.x.
64. Pabreja K, Dua K, Sharma S, Padi SSV, Kulkarni SK. Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. Eur J Pharmacol. 2011;661:15–21. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.04.014.
65. Zychowska M, Rojewska E, Piotrowska A, Kreiner G, Mika J. Microglial inhibition influences XCL1/XCR1 expression and causes analgesic effects in a mouse model of Diabetic Neuropathy. Anesthesiology. 2016;125:573–89. https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001219.
66. Zychowska M, Rojewska E, Piotrowska A, Kreiner G, Nalepa I, Mika J. Spinal CCL1/CCR8 signaling interplay as a potential therapeutic target– evidence from a mouse diabetic neuropathy model. Int Immunopharmacol. 2017;52:261–71. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.09.021.
67. Spollett GR. Diabetic neuropathies: diagnosis and treatment. Nurs Clin North Am. 2006;41:697–717. https://doi.org/10.1016/j.cnur.2006.07.012.
68. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, Zochodne DW, Wright DE, Bennett DL, et al. Diabetic neuropathy. Nat Rev Dis Prim. 2019;5:41. https://doi.org/10.1038/s41572-019-0092-1.
69. Said G. Diabetic neuropathy–a review. Nat Clin Pract Neurol. 2007;3:331–40. https://doi.org/10.1038/NCPNEURO0504.
70. Przeklasa-Muszynska A, Dobrogowski J. Transdermal buprenorphine for the treatment of moderate to severe chronic pain: results from a large multicenter, non-interventional post-marketing study in Poland. Curr Med Res Opin. 2011;27:1109–17. https://doi.org/10.1185/03007995.2011.569017.
71. Zurek JR, Nadeson R, Goodchild CS. Spinal and supraspinal components of opioid antinociception in streptozotocin induced diabetic neuropathy in rats. Pain. 2001;90:57–63. https://doi.org/10.1016/S0304-3959(00)00386-9.
72. Mika J, Wawrzczak-Bargiela A, Osikowicz M, Makuch W, Przewlocka B. Attenuation of morphine tolerance by minocycline and pentoxifylline in naive and neuropathic mice. Brain Behav Immun. 2009;23:75–84. https://doi.org/10.1016/J.BBI.2008.07.005.
73. Sidarala V, Kowluru A. The Regulatory roles of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathways in Health and Diabetes: lessons learned from the pancreatic β-Cell. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov. 2017;10:76–84. https://doi.org/10.2174/1872214810666161020154905.
74. Wijesekara N, Krishnamurthy M, Bhattacharjee A, Suhail A, Sweeney G, Wheeler MB. Adiponectin-induced ERK and akt phosphorylation protects against pancreatic beta cell apoptosis and increases insulin gene expression and secretion. J Biol Chem. 2010;285:33623–31. https://doi.org/10.1074/JBC.M109.085084.
75. Benes C, Poitout V, Marie JC, Martin-Perez J, Roisin MP, Fagard R. Mode of regulation of the extracellular signal-regulated kinases in the pancreatic beta-cell line MIN6 and their implication in the regulation of insulin gene transcription. Biochem J. 1999;340:219–25. https://doi.org/10.1042/0264-6021:3400219.
76. Longuet C, Broca C, Costes S, Hani EH, Bataille D, Dalle S. Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans. Endocrinology. 2005;146:643–54. https://doi.org/10.1210/EN.2004-0841.
77. Yeo RWY, Yang K, Li GD, Lim SK. High glucose predisposes gene expression and ERK phosphorylation to apoptosis and impaired glucose-stimulated insulin secretion via the cytoskeleton. PLoS

ONE. 2012;7. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0044988.
78. Uchiyama K, Naito Y, Hasegawa G, Nakamura N, Takahashi J, Yoshikawa T. Astaxanthin protects β-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. Redox Rep. 2002;7:290–3. https://doi.org/10.1179/135100002125000811.
79. Bhattarai G, So HS, Kieu TTT, Kook SH, Lee JC, Jeon YM. Astaxanthin inhibits diabetes-triggered Periodontal Destruction, ameliorates oxidative complications in STZ-Injected mice, and recovers Nrf2-Dependent antioxidant system. Nutrients. 2021;13:1–18. https://doi.org/10.3390/NU13103575.
80. Yeh P-T, Huang H-W, Yang C-M, Yang W-S, Yang C-H. Astaxanthin inhibits expression of retinal oxidative stress and Inflammatory mediators in Streptozotocin-Induced Diabetic rats. PLoS ONE. 2016;11:e0146438. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146438.
81. Bahbah EI, Ghozy S, Attia MS, Negida A, Emran T, Bin, Mitra S, et al. Molecular mechanisms of Astaxanthin as a potential Neurotherapeutic Agent. Mar Drugs. 2021;19:201. https://doi.org/10.3390/MD19040201.
82. Niu T, Zhou J, Wang F, Xuan R, Chen J, Wu W, et al. Safety assessment of astaxanthin from Haematococcus pluvialis: Acute toxicity, genotoxicity, distribution and repeat-dose toxicity studies in gestation mice. Regul Toxicol Pharmacol. 2020;115:104695. https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2020.104695.
83. Medoro A, Davinelli S, Milella L, Willcox BJ, Allsopp RC, Scapagnini G, et al. Dietary astaxanthin: a promising antioxidant and anti-inflammatory Agent for Brain Aging and Adult Neurogenesis. Mar Drugs. 2023;21. https://doi.org/10.3390/MD21120643.
84. Zhou Y-Q, Liu D-Q, Chen S-P, Sun J, Wang X-M, Tian Y-K, et al. Minocycline as a promising therapeutic strategy for chronic pain. Pharmacol Res. 2018;134:305–10. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.07.002.
85. Han M, Huang RY, Du YM, Zhao ZQ, Zhang YQ. Early intervention of ERK activation in the spinal cord can block initiation of peripheral nerve injury-induced neuropathic pain in rats. Sheng Li Xue Bao 2011;63.
86. Zhuang Z-Y, Gerner P, Woolf CJ, Ji R-R. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. Pain. 2005;114:149–59. https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.12.022.
87. Ciruela A, Dixon AK, Bramwell S, Gonzalez MI, Pinnock RD, Lee K. Identification of MEK1 as a novel target for the treatment of neuropathic pain. Br J Pharmacol. 2003;138:751–6. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705103.
88. Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Inoue K. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. Glia. 2004;45:89–95. https://doi.org/10.1002/glia.10308.
89. Rojewska E, Popiolek-Barczyk K, Jurga AM, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Involvement of pro- and antinociceptive factors in minocycline analgesia in rat neuropathic pain model. J Neuroimmunol. 2014;277:57–66. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.09.020.
90. Wen YR, Suter MR, Kawasaki Y, Huang J, Pertin M, Kohno T, et al. Nerve conduction blockade in the sciatic nerve prevents but does not reverse the activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia in the rat spared nerve Injury Model. Anesthesiology. 2007;107:312–21. https://doi.org/10.1097/01.ANES.0000270759.11086.E7.
91. Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, Borsello T, Bonny C, Strichartz GR, et al. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. J Neurosci. 2006;26. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5290-05.2006.
92. He N, Qu YJ, Li DY, Yue SW. RIP3 inhibition ameliorates chronic constriction injury-induced neuropathic pain by suppressing JNK signaling. Aging. 2021;13:24417–31. https://doi.org/10.18632/AGING.203691.
93. Anand P, Shenoy R, Palmer JE, Baines AJ, Lai RYK, Robertson J, et al. Clinical trial of the p38 MAP kinase inhibitor dilmapimod in neuropathic pain following nerve injury. Eur J Pain. 2011;15:1040–8. https://doi.org/10.1016/J.EJPAIN.2011.04.005.
94. Ostenfeld T, Krishen A, Lai RY, Bullman J, Green J, Anand P, et al. A randomized, placebo-controlled trial of the analgesic efficacy and safety of the p38 MAP kinase inhibitor, losmapimod, in patients with neuropathic pain from lumbosacral radiculopathy. Clin J Pain. 2015;31:283–93. https://doi.org/10.1097/AJP.0000000000000122.
95. Piotrowska A, Popiolek-Barczyk K, Pavone F, Mika J. Comparison of the expression changes after Botulinum Toxin Type A and Minocycline Administration in Lipopolysaccharide-stimulated rat microglial and astroglial cultures. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00141.
96. Ciechanowska A, Rojewska E, Piotrowska A, Barut J, Pawlik K, Ciapała K, et al. New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies. Front Immunol. 2022;13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1058204.
97. Wu Q, Zhang X-S, Wang H-D, Zhang X, Yu Q, Li W, et al. Astaxanthin activates nuclear factor erythroid-related factor 2 and the antioxidant responsive element (Nrf2-ARE) pathway in the brain after subarachnoid hemorrhage in rats and attenuates early Brain Injury. Mar Drugs. 2014;12:6125–41. https://doi.org/10.3390/md12126125.
98. Feng F, Qiu H. Neuroprotective effect of tanshinone IIA against neuropathic pain in diabetic rats through the Nrf2/ARE and NF-κB signaling pathways. Kaohsiung J Med Sci. 2018;34:428–37. https://doi.org/10.1016/j.kjms.2018.03.005.
99. Sun J, Li JY, Zhang LQ, Li DY, Wu JY, Gao SJ et al. Nrf2 activation attenuates chronic Constriction Injury-Induced Neuropathic Pain via induction of PGC-1 α -Mediated mitochondrial Biogenesis in the spinal cord. Oxid Med Cell Longev 2021;2021. https://doi.org/10.1155/2021/9577874
100. Zhou Y, Liu D, Chen S, Chen N, Sun J, Wang X, et al. Nrf2 activation ameliorates mechanical allodynia in paclitaxel-induced neuropathic pain. Acta Pharmacol Sin. 2020;41:1041–8. https://doi.org/10.1038/s41401-020-0394-6.
101. Yates MS, Tauchi M, Katsuoka F, Flanders KC, Liby KT, Honda T, et al. Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes. Mol Cancer Ther. 2007;6:154–62. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0516.
102. Wu J, Liu X, Fan J, Chen W, Wang J, Zeng Y, et al. Bardoxolone methyl (BARD) ameliorates aristolochic acid (AA)-induced acute kidney injury through Nrf2 pathway. Toxicology. 2014;318:22–31. https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.01.008.
103. Chien JY, Chou YY, Ciou JW, Liu FY, Huang SP. The effects of two Nrf2 activators, bardoxolone methyl and omaveloxolone, on retinal ganglion cell survival during ischemic optic neuropathy. Antioxidants. 2021;10:1–18. https://doi.org/10.3390/antiox10091466.
104. Kalvala AK, Kumar R, Sherkhane B, Gundu C, Arruri VK, Kumar A. Bardoxolone Methyl ameliorates Hyperglycemia Induced mitochondrial dysfunction by activating the keap1-Nrf2-ARE pathway in Experimental Diabetic Neuropathy. Mol Neurobiol. 2020;57:3616–31. https://doi.org/10.1007/S12035-020-01989-0.

105. Mayer DJ, Mao J, Price DD. The development of morphine tolerance and dependence is associated with translocation of protein kinase C. Pain. 1995;61:365–74. https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)00023-L.
106. Mao J, Price DD, Mayer DJ. Mechanisms of hyperalgesian and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. Pain. 1995;62:259–74. https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)00073-2.
107. Christensen D, Kayser V. The development of pain-related behaviour and opioid tolerance after neuropathy-inducing surgery and sham surgery. Pain. 2000;88:231–8. https://doi.org/10.1016/S0304-3959(00)00334-1.
108. Wen Y-R, Tan P-H, Cheng J-K, Liu Y-C, Ji R-R, Microglia. A Promising Target for Treating Neuropathic and Postoperative Pain, and Morphine Tolerance. J Formos Med Assoc. 2011;110:487–94. https://doi.org/10.1016/S0929-6646(11)60074-0.
109. Mika J. Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. Pharmacol Rep. 2008;60:175–6.
110. Piao ZG, Cho IH, Park CK, Hong JP, Choi SY, Lee SJ, et al. Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. Pain. 2006;121:219–31. https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2005.12.023.
111. Ferreira-Chamorro P, Redondo A, Riego G, Pol O. Treatment with 5-fluoro-2-oxindole increases the Antinociceptive effects of Morphine and inhibits Neuropathic Pain. Cell Mol Neurobiol. 2021;41:995–1008. https://doi.org/10.1007/s10571-020-00952-w.
112. Ferreira-Chamorro P, Redondo A, Riego G, Leánez S, Pol O. Sulforaphane inhibited the nociceptive responses, anxiety- and depressive-like behaviors Associated with Neuropathic Pain and Improved the Anti-allodynic effects of Morphine in mice. Front Pharmacol. 2018;9. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01332.
113. Hervera A, Leánez S, Pol O. The inhibition of the nitric oxide–cGMP–PKG–JNK signaling pathway avoids the development of tolerance to the local antiallodynic effects produced by morphine during neuropathic pain. Eur J Pharmacol. 2012;685:42–51. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.04.009.
114. Okerman T, Jurgenson T, Moore M, Klein AH. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase-AKT-cyclic GMP-c-Jun N-terminal kinase signaling pathway attenuates the development of morphine tolerance in a mouse model of neuropathic pain. Mol Pain. 2021;17:174480692110033. https://doi.org/10.1177/17448069211003375.
115. DuPen A, Shen D, Ersek M. Mechanisms of opioid-induced tolerance and hyperalgesia. Pain Manag Nurs. 2007;8:113–21. https://doi.org/10.1016/J.PMN.2007.02.004.
116. Mercadante S, Arcuri E, Santoni A. Opioid-Induced Tolerance and Hyperalgesia. CNS Drugs. 2019;33:943–55. https://doi.org/10.1007/S40263-019-00660-0.
117. Mao J. Opioid-induced abnormal pain sensitivity: implications in clinical opioid therapy. Pain. 2002;100:213–7. https://doi.org/10.1016/S0304-3959(02)00422-0.
118. Mao J, Price DD, Mayer DJ. Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. J Neurosci. 1994;14:2301–12. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-04-02301.1994.
119. Kandy SK, Nimonkar MM, Dash SS, Mehta B, Markandeya YS. Astaxanthin Protection against neuronal excitotoxicity via glutamate receptor inhibition and improvement of mitochondrial function. Mar Drugs. 2022;20:645. https://doi.org/10.3390/MD20100645/S1.
120. Sonza A, Sanada LS, de Oliveira LR, Bernardo-Filho M, de Sá-Caputo DdaC, Zaro MA, et al. Whole-body vibration mediates mechanical hypersensitivity through Aβ-fiber and C-fiber thermal sensation in a chronic pain model. Exp Biol Med (Maywood). 2021;246:1210–8. https://doi.org/10.1177/1535370221991147.
121. Sweitzer SM, Medicherla S, Almirez R, Dugar S, Chakravarty S, Shumilla JA, et al. Antinociceptive action of a p38alpha MAPK inhibitor, SD-282, in a diabetic neuropathy model. Pain. 2004;109:409–19. https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2004.02.016.
122. Liao Y, Wang H, Li S, Xue Y, Chen Y, Adu-Frimpong M, et al. Preparation of astaxanthin-loaded composite micelles with coaxial electrospray technology for enhanced oral bioavailability and improved antioxidation capability. J Sci Food Agric. 2024;104:1408–19. https://doi.org/10.1002/JSFA.13019.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

5. DYSKUSJA

Leczenie bólu neuropatycznego pozostaje jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny. Pomimo stale udoskonalanych strategii terapeutycznych, pełna i długotrwała kontrola objawów w praktyce klinicznej jest rzadko osiągana, co znacząco utrudnia codzienne funkcjonowanie pacjentów. Skala problemu narasta w związku ze starzeniem się społeczeństwa oraz rosnącą częstością występowania chorób predysponujących do rozwoju bólu neuropatycznego. W kontekście powyższych kwestii coraz wyraźniej zaznacza się potrzeba opracowania skuteczniejszych sposobów leczenia, zarówno w zakresie poszukiwania nowych substancji o działaniu przeciwbólowym, jak i koanalgetyków. Wyniki badań przedstawione w niniejszej dysertacji, uzupełnione danymi z prac przeglądowych **Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2021**[80] oraz **Ciapała i Mika, *Pharmaceuticals*, 2023**[141] potwierdzają wielopoziomowy i złożony charakter patomechanizmów bólu neuropatycznego. Jednocześnie wskazują, że zarówno szlak kynureninowy, jak i wybrane wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe pełnią w nich istotną rolę, co może otwierać nowe perspektywy dla identyfikacji potencjalnych punktów uchwytu terapii.

W ostatnich latach coraz więcej badań koncentruje się na zmianach w katabolizmie tryptofanu, które mają kluczowe znaczenie dla funkcjonowania układu nerwowego[222–225]. Dowiedziono, że metabolity szlaku kynureninowego oddziałują bezpośrednio lub pośrednio nie tylko na neuroprzekaźniki[58,226,227], ale także uczestniczą w regulacji odpowiedzi immunologicznej[228]. Mediatory zapalne mogą wpływać na aktywność i ekspresję enzymów szlaku, koordynując w ten sposób zmiany metaboliczne, co z kolei może modulować odpowiedź komórek układu immunologicznego, tworząc pętlę wzajemnych interakcji[229]. Wyniki przeprowadzonych przez nas eksperymentów po raz pierwszy wskazują, że farmakologiczna modulacja szlaku kynureninowego na różnych jego etapach powoduje spadek nadwrażliwości u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego **Ciapała i wsp., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023**[170]. Pierwsza reakcja w tym szlaku, polegająca na przekształceniu tryptofanu do N-formylo-L-kynureniny, zachodzi dzięki enzymom 2,3-dioksygenazie tryptofanowej (ang. *tryptophan 2,3-dioxygenase*, TDO) oraz IDO 1 i 2. Przeprowadzona przez nas analiza mRNA nie wykazała zmian w ekspresji *Tdo2* w rdzeniu kręgowym u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego **Ciapała i wsp., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023**[170], co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, w których w analogicznym modelu bólu neuropatycznego u szczurów również nie stwierdzono takich zmian[79]. Natomiast dotychczas opublikowane dane wskazują, że cytokiny o działaniu pronocyceptywnym, takie jak TNF-α, IL-1β i IL-6[230,231], uwalniane na poziomie rdzenia kręgowego w następstwie uszkodzenia nerwów, indukują ekspresję IDO[229]. W naszych

eksperymentach przeprowadzonych w dniu 7 po uszkodzeniu nerwu kulszowego zaobserwowaliśmy spadek ekspresji mRNA *Ido1,* przy jednoczesnym braku zmian *Ido2.* Mimo, że nasze poprzednie badania w modelu szczurzym wskazywały na wzrost ekspresji *Ido2* w tym punkcie czasowym[79]*,* rozbieżności te mogą wynikać z opisywanych w literaturze różnic międzygatunkowych w aktywności enzymów szlaku kynureninowego w czasie[185]. Niemniej, nie wyklucza to zaangażowania IDO 1 i 2 w mechanizmy bólu neuropatycznego, ponieważ poziom mRNA nie musi bezpośrednio odzwierciedlać aktywności enzymatycznej ani lokalnej dynamiki metabolizmu tryptofanu. Co ważne, wykonane przez nas eksperymenty behawioralne wykazały, że podpajęczynówkowe podanie 1-metyl-D-tryptofanu, inhibitora IDO, powoduje spadek nadwrażliwości na bodźce dotykowe i termiczne, co udowadnia, że modulacja tego etapu szlaku może korzystnie wpływać na transmisję nocyceptywną **Ciapała i wsp., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023**[170]. Warto zaznaczyć, że wiele typów nowotworów wykazuje nadekspresję IDO, co spowodowało, że stał się on potencjalnym celem interwencji terapeutycznej w onkologii[232]. W efekcie zsyntezowano dotychczas kilka inhibitorów IDO, niektóre zostały nawet przetestowane w badaniach klinicznych, jak na przykład epacadostat[233] i navoximod[234], a także inhibitor zastosowany w naszych badaniach, 1-metyl-D-tryptofan, pod nazwą handlową indoximod[235]. Wiele z tych związków, ze względu na strukturalne podobieństwo do tryptofanu/L-kynureniny, spełnia kryteria funkcjonalne pozwalające uznać je za potencjalne ligandy AhR[236]. AhR jest w istocie czynnikiem transkrypcyjnym występującym w cytoplazmie wielu komórek, w tym neuronalnych i glejowych, pełniąc wiele różnych funkcji związanych w szczególności z odpowiedzią immunologiczną i zachowaniem homeostazy[237–239]. Rola AhR w transmisji bólowej pozostaje wciąż słabo poznana, jednak najnowsze badania wskazują, że jego aktywacja zmniejsza nadwrażliwość na bodźce u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego, podczas gdy zwierzęta z delecją genu *AhR* wykazują jej znaczne nasilenie[240]. Dane literaturowe sugerują, że 1-metyl-D-tryptofan, niezależnie od bycia inhibitorem IDO, może działać jako agonista AhR[236,241,242]. Jest zatem prawdopodobne, że również ten mechanizm może odpowiadać za obserwowane przez nas korzystne efekty 1-metyl-D-tryptofanu, jednak kwestia ta wymaga dalszych wnikliwych badań.

W efekcie działania IDO dochodzi do powstawania L-kynureniny, głównego metabolitu szlaku kynureninowego. Dane literaturowe sugerowały jej istotną rolę w bólu ostrym[243] i zapalnym[244], a pierwsze doniesienia dotyczące neuropatii pojawiły się w 2013 roku, kiedy to zespół Pineda-Farias wykazał, że dootrzewnowe podanie L-kynureniny nie wpływa na nadwrażliwość dotykową u szczurów w modelu podwiązania nerwu rdzeniowego[245]. Niemniej, w naszych eksperymentach zaobserwowaliśmy, że L-kynurenina, podawana

zarówno drogą podpajęczynówkową jak i dożylną, obniża nadwrażliwość u myszy w modelu podwiązania nerwu kulszowego **Ciapała i wsp., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023**[170]. Obserwowane różnice w uzyskanych rezultatach mogą wynikać z wielu czynników, takich jak zastosowanie różnego gatunku gryzoni, odmiennego modelu bólu neuropatycznego oraz innej drogi podania badanych substancji. Nadal brakuje jednoznacznych ustaleń, dotyczących mechanizmu molekularnego, który mógłby być odpowiedzialny za korzystne działanie L-kynureniny w neuropatii. W niedawno opublikowanych pracach autorzy sugerują, że L-kynurenina jest endogennym agonistą wspomnianego wcześniej AhR[246,247] i może tą drogą modulować poziom reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species,* ROS)[248]. Wiadomo, że ROS są zaangażowane w rozwój i utrzymywanie się bólu neuropatycznego, a ich eliminacja przez substancje wychwytujące wolne rodniki łagodzi objawy bólowe w zwierzęcych modelach bólu[249]. Co więcej, wykazano również, że ROS mogą powodować sensytyzację ośrodkową, gdyż uczestniczą w fosforylacji receptorów NMDA w rdzeniu kręgowym[250]. Kolejnym potencjalnym mechanizmem odpowiadającym za efekt analgetyczny L-kynureniny może być przesunięcie równowagi szlaku w kierunku syntezy neuroprotekcyjnego kwasu kynureninowego. Dzieje się to przy udziale enzymów KAT1 i 2, których ekspresja, jak wykazaliśmy w naszych badaniach, nie zmniejsza się w rdzeniu kręgowym po uszkodzeniu nerwu kulszowego **Ciapała i wsp., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023**[170]. W literaturze kwas kynureninowy, będący antagonistą receptorów NMDA, wskazywany jest jako związek o potencjalnie korzystnym działaniu w łagodzeniu migreny[77,251], a nasze wcześniejsze eksperymenty wykazały jego efekt przeciwbólowy również w modelu bólu neuropatycznego[46]. Co więcej, działa on przeciwzapalnie jako agonista AhR[252], a ponadto dowiedziono, że aktywacja receptora sprzężonego z białkiem G 35 (ang. *G protein-coupled receptor 35,* GPR35) przez kwas kynureninowy prowadzi do spadku mobilizacji jonów wapnia[253,254]. Przejściowe zmiany stężenia tych jonów w cytoplazmie są kluczowe dla uwalniania neuroprzekaźników i regulacji pobudliwości błony komórkowej[255], natomiast długotrwały wzrost uznawany jest za jeden z mechanizmów nadpobudliwości neuronów w bólu neuropatycznym[190]. Wszystkie wymienione mechanizmy mogą leżeć u podstaw przeciwbólowych efektów L-kynureniny w neuropatii, lecz ich precyzyjne określenie niewątpliwie wymaga dodatkowych badań.

Co niezmiernie istotne, oprócz konwersji do kwasu kynureninowego, L-kynurenina może również być metabolizowana do 3-hydroksy-L-kynureniny, przy udziale KMO. Przeprowadzone przez nas badania po raz pierwszy wykazały, że po uszkodzeniu nerwu kulszowego u myszy dochodzi do wzrostu ekspresji genu *Kmo* w rdzeniu kręgowym, a po zastosowaniu UPF648, inhibitora KMO, obserwowaliśmy obniżenie nadwrażliwości

na bodźce dotykowe i termiczne **Ciapała i wsp., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023**[170]. Wynik ten jest spójny z wcześniejszymi danymi, które uzyskaliśmy w szczurzym modelu neuropatii, wskazującymi, że również inhibitory KMO o innej strukturze chemicznej, takie jak Ro61-804 oraz jego prolek JM6, wykazują działanie przeciwbólowe[33]. Co więcej, badania te udowodniły, że Ro61-6048 obniża ekspresję mRNA markerów aktywacji mikrogleju oraz jednocześnie zmniejsza poziom czynników o właściwościach pronocyceptywnych, takich jak IL-1β, IL-6 i NOS2, w rdzeniu kręgowym i/lub zwojach korzeni grzbietowych[33]. Coraz bogatsze dane literaturowe również potwierdzają, że hamowanie KMO ma działanie neuroprotekcyjne w zwierzęcych modelach hipoksji[256], choroby Huntingtona[257] i choroby Alzheimera[257], a także w niedokrwieniu mózgu[258]. Nasze badania po raz pierwszy wykazały, że zastosowanie L-kynureniny razem z UPF648 powoduje efektywniejsze obniżenie nadwrażliwości w modelu bólu neuropatycznego **Ciapała i wsp., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023**[170]. Uzyskane wyniki wspierają hipotezę, że hamowanie KMO w warunkach zwiększonej dostępności jego substratu sprzyja przekierowaniu szlaku w stronę syntezy kwasu kynureninowego, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi[257,259]. Końcowym produktem gałęzi szlaku kynureninowego katalizowanej przez KMO jest kwas chinolinowy, który najprawdopodobniej przyczynia się do rozwoju bólu neuropatycznego. Już w latach 80. XX wieku postulowano, że kwas chinolinowy aktywuje receptor NMDA w stopniu porównywalnym do glutaminianu[260]. Należy jednak dodać, że glutaminian jest szybko usuwany z synaps dzięki systemom wychwytu o wysokim powinowactwie, natomiast kwas chinolinowy, chociaż również podlega wychwytowi, to enzym odpowiedzialny za jego metabolizm, fosforybozylotransferaza kwasu chinolinowego (ang. *quinolinate phosphoribosyltransferase,* QPRT), ulega szybkiemu wysyceniu[261]. W efekcie nadmiar kwasu chinolinowego może w sposób ciągły stymulować receptory NMDA, szczególnie te zawierające podjednostki NR2A i NR2B, działając neurotoksycznie[62]. W świetle tych danych można wysnuć hipotezę, że zahamowanie aktywności KMO działa korzystnie w bólu neuropatycznym nie tylko poprzez przesunięcie równowagi szlaku w stronę syntezy szlaku kynureninowego, ale głównie poprzez ograniczenie produkcji kwasu chinolinowego.

Warto również podkreślić, że nasze eksperymenty są jednymi z pierwszych, w których wskazujemy na korzystny wpływ farmakologicznej modulacji szlaku kynureninowego na przeciwbólowe działanie leków opioidowych w neuropatii. Związki te są szeroko stosowane w leczeniu bólu, jednakże w przypadku uszkodzenia nerwów ich działanie jest mniej efektywne, co często wymaga stosowania wysokich dawek, a to przekłada się na zwiększone ryzyko wystąpienia działań niepożądanych[189,262]. Wykazaliśmy, że zastosowanie L-kynureniny

w łączonym podaniu z morfiną, buprenorfiną lub oksykodonem skutkuje silniejszym efektem analgetycznym w testach behawioralnych, zarówno po podaniu podpajęczynówkowym, jak i dożylnym. W analogicznym schemacie eksperymentalnym po podaniach podpajęczynówkowych, UPF648, inhibitor KMO, wywoływał podobne efekty w zastosowaniu razem z morfiną lub buprenorfiną, natomiast 1-metyl-D-tryptofan, inhibitor IDO, jedynie w połączeniu z morfiną **Ciapała i wsp., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023**[170]. Nadal potrzebne są szczegółowe badania, które pozwoliłyby w pełni wyjaśnić obserwowane przez nas efekty. Wiadomo jednak, że stosowane leki opioidowe różnią się pod względem struktury chemicznej, właściwości fizykochemicznych oraz parametrów farmakokinetycznych[162,263,264]. W badaniach przeprowadzonych przez nasz zespół podpajęczynówkowe podanie Ro61-804 lub JM6 z morfiną u szczurów również wywoływało silniejszy spadek nadwrażliwości na bodźce dotykowe i termiczne[33]. Podobnie wykazaliśmy, że zastosowanie kwasu kynureninowego również korzystnie wpływa na działanie morfiny u myszy[46], należy jednak podkreślić, że nie przeprowadzaliśmy analogicznych eksperymentów z innymi lekami opioidowymi. Potencjalne mechanizmy interakcji szlaku kynureninowego z endogennym układem opioidowym nie zostały dotychczas szczegółowo zbadane. Warto jednak zaznaczyć, że w 2014 roku Zador i wsp. wykazali, że kwas kynureninowy i jego analog KA1, mimo braku bezpośredniego powinowactwa do receptorów opioidowych MOR, DOR czy KOR, mogą modulować ich działanie poprzez wpływ na białka G[265]. Literatura z ostatnich kilku lat wyraźnie sugeruje, że jednym z mechanizmów utraty skuteczności opioidów w bólu neuropatycznym jest aktywacja komórek glejowych[26,266]. Z badań wykonanych wcześniej w Zakładzie Farmakologii Bólu wynika, że minocyklina, inhibitor aktywacji, infiltracji i proliferacji mikrogleju/makrofagów, wpływa korzystnie na działanie przeciwbólowe leków opioidowych[193,210,267]. Równocześnie w literaturze podkreślane jest, że aktywacja KMO zachodzi szczególnie w komórkach mikrogleju[58,59]. Przeprowadzona przez nas analiza zmian molekularnych w rdzeniu kręgowym po podaniu minocykliny potwierdza te obserwacje, wykazując zmniejszony stopień aktywacji mikrogleju oraz obniżoną ekspresję enzymu KMO u szczurów po uszkodzeniu nerwu[184]. Eksperymenty przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej udowodniły, że również dożylne podanie minocykliny prowadzi do zmniejszenia nadwrażliwość na bodźce dotykowe, a jej łączne podanie z L-kynureniną wzmacnia obserwowany efekt analgetyczny **Ciapała i wsp., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023**[170]. Uzyskany przez nas wynik sugeruje, że hamowanie aktywności/infiltracji/proliferacji mikrogleju/makrofagów przekłada się także na spadek aktywności KMO. Warto jednak zaznaczyć, że najnowsze eksperymenty dotyczące komórkowej lokalizacji KMO podważają tradycyjny pogląd o jego ekspresji ograniczonej

do mikrogleju[268,269]. Dystrybucja KMO w układzie nerwowym zdaje się zatem być zdecydowanie bardziej złożona niż dotychczas sądzono. Obecne kierunki badań nad szlakiem kynureninowym mają na celu nie tylko precyzyjne wyjaśnienie jego roli w funkcjonowaniu układu nerwowego, lecz koncentrują się także na zwiększeniu terapeutycznego potencjału jego metabolitów, takich jak kwas kynureninowy. Co ciekawe, istnieją także dowody na różnice międzypłciowe w metabolizmie szlaku kynureninowego, które mogą wpływać na stężenia tryptofanu lub kynurenin, zwłaszcza w warunkach stanów zapalnych lub chorób neurodegeneracyjnych, choć dane te nadal pozostają fragmentaryczne i wymagają dalszej weryfikacji[270–273]. Doświadczenia przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej poszerzają aktualną wiedzę na temat udziału szlaku kynureninowego w patomechanizmach bólu neuropatycznego, jednocześnie wskazując, że zagadnienie to nadal wymaga dalszych, pogłębionych analiz. Wyniki te mogą przyczynić się do udoskonalenia obecnie stosowanych metod leczenia bólu neuropatycznego lub umożliwić opracowanie nowych strategii nie tylko terapeutycznych, ale i profilaktycznych. Niedawno opracowano specjalne nanocząsteczki, które znacząco poprawiają przenikanie kwasu kynureninowego przez barierę krew-mózg[274], oraz zsyntezowano wiele jego analogów[275]. Ponadto w 2020 roku stworzono nowe syntetyczne peptydy zawierające reszty L-kynureniny lub kwasu kynureninowego, działające agonistycznie względem MOR, a wstępne wyniki badań behawioralnych przeprowadzone jak dotąd jedynie w bólu ostrym wskazują, że peptydy te mają działanie przeciwbólowe[276]. W naszej ocenie dalsze prowadzenie badań dotyczących szlaku kynureninowego w modelach bólu neuropatycznego o różnej etiologii, zarówno u samic jak i u samców myszy i szczurów byłoby niezwykle cenne i mamy nadzieję kontynuować prace eksperymentalne w przyszłości.

Wspomniana wcześniej minocyklina, będąca inhibitorem aktywacji, infiltracji i proliferacji mikrogleju oraz makrofagów, od wielu lat jest opisywana w literaturze jako związek skutecznie łagodzący objawy nadwrażliwości w modelach bólu neuropatycznego[200,210,277,278]. Choć została zsyntetyzowana w latach 60. XX wieku jako pochodna tetracykliny i była początkowo stosowana w leczeniu zakażeń bakteryjnych, późniejsze badania wykazały jej dodatkowe właściwości przeciwzapalne i neuroprotekcyjne[279]. Początkowo udokumentowano, że molekularny mechanizm działania minocykliny polega na hamowaniu aktywności kinazy p38 w komórkach mikrogleju[196], a następnie wykazano że jest ona również inhibitorem MMP-9[280]. Podania wielokrotne minocykliny, poza zmniejszeniem aktywacji mikrogleju, powodują także spadek ekspresji czynników o właściwościach pronocyceptywnych takich jak IL-6, IL-18, CCL2 i XCL1 w rdzeniu kręgowym w modelu bólu neuropatycznego[37,106,281]. Ponadto doświadczenia przeprowadzone przez prof. Joannę Mikę wykazały, że minocyklina korzystnie wpływa na analgezję morfinową

w neuropatii, a nawet osłabia rozwój tolerancji morfinowej[32,210]. Skuteczność minocykliny, jak również wyniki badań wskazujących na przeciwbólowe działanie różnych selektywnych modulatorów MAPK w neuropatii[93–95,97–100,102,104–108,114], zainspirowały nas do prowadzenia dalszych poszukiwań związków oddziałujących na wiele mechanizmów molekularnych zaangażowanych w rozwój bólu neuropatycznego.

Dobór badanych substancji nie był przypadkowy, lecz wynikał z przeprowadzonej przez nas analizy kluczowych szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej uczestniczących w rozwoju neuropatii, w szczególności kaskady MAPK. Wykonane przez nas eksperymenty wykazały, że spośród nieselektywnych modulatorów MAPK to peimina (inhibitor MAPK oraz NF-κB), fisetyna (inhibitor ERK1/2 i NF-κB, modulator PI3K) i astaksantyna (inhibitor MAPK, aktywator Nrf2) skutecznie zmniejszają nadwrażliwość dotykową i termiczną u myszy po uszkodzeniu nerwu, podczas gdy artemizynina (inhibitor MAPK, aktywator NF-κB) nie wykazywała takich właściwości w zastosowanym modelu bólu neuropatycznego **Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2023**[171]. Ich efekt przeciwbólowy jest najprawdopodobniej związany ze zdolnością hamowania kinaz MAP. Z literatury wiadomo, że kinaza ERK1/2 uczestniczy w fosforylacji kanałów potasowych, a także w zmianach funkcjonowania kanałów wapniowych bramkowanych napięciem w neuronach czuciowych[282]. Udowodniono także, że jej selektywne zablokowanie za pomocą związków takich jak PD198306[98], U0126[95,97] lub PD98059[93,99] działa korzystnie w zwierzęcych modelach neuropatii. Podobnie, fosforylacja p38 uznawana jest za jedną z kluczowych przemian przyczyniających się do rozwoju neuropatii, co potwierdzają liczne dane wskazujące na jej nasilenie w różnych modelach bólu[100,283–286]. Niektóre badania, w tym także te przeprowadzone przez zespół Zakładu Farmakologii Bólu, wykazały, że podpajęczynówkowe podanie selektywnych inhibitorów p38 takich jak SB203580[100,102,106] i FR167653[104] wykazuje działanie przeciwbólowe w neuropatii. Co szczególnie ważne, podjęto już wstępne próby kliniczne oceniające działanie inhibitorów p38, dilmapimodu[112](SB-681323) i losmapimodu (GW856553)[113], u pacjentów z bólem neuropatycznym. Spośród tych dwóch związków to dilmapimod charakteryzował się obiecującą skutecznością przeciwbólową we wczesnej fazie badań i był dobrze tolerowany przez pacjentów[112], jednak nadal brakuje jego oceny w większych, randomizowanych badaniach klinicznych. Kaskada JNK również zaangażowana jest w procesy nocycepcji i podobnie jak w przypadku pozostałych MAPK, jej selektywne zablokowanie zmniejsza nadwrażliwość na bodźce w bólu neuropatycznym[114,117]. Ponieważ selektywne inhibitory p38, ERK1/2 oraz JNK wykazują skuteczność w modelach zwierzęcych, wysnuliśmy hipotezę, że związki modulujące aktywność całej rodziny MAPK mogą charakteryzować się jeszcze większym potencjałem przeciwbólowym. Ku naszemu zaskoczeniu, artemizynina - związek

który został wyizolowany z bylicy rocznej (*Artemisia annua*), a za odkrycie jego przeciwmalarycznych właściwości przyznano w 2015 roku Nagrodę Nobla – mimo działania hamującego MAPK[287,288], nie wykazywała działania analgetycznego po jednorazowym podaniu podpajęczynówkowym u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego **Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2023**[171]. Badania przeprowadzone przez innych autorów sugerują jednak, że substancja ta może wywoływać efekt przeciwbólowy w neuropatii, jednak konieczne jest zastosowanie wielokrotnych podań dootrzewnowych, co podkreśla skomplikowany mechanizm działania tego związku[289–291]. Brak efektu przeciwbólowego w naszych badaniach może wynikać z zastosowania jednorazowego podania podpajęczynówkowego, które — w przeciwieństwie do wielokrotnego podania obwodowego zastosowanego przez innych autorów — mogło nie zapewnić wystarczającej i długotrwałej ekspozycji neuronów rdzenia kręgowego na substancję, zwłaszcza biorąc pod uwagę jej relatywnie krótki okres półtrwania[292]. Należy też uwzględnić, że artemizynina i jej pochodne w określonych warunkach mogą indukować procesy apoptotyczne i wykazywać działanie neurotoksyczne, co może wpływać na obserwowany efekt farmakologiczny[292,293]. Ponadto dostępne dane literaturowe wskazują, że poza działaniem na kinazy MAP artemizynina wpływa również na aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB[288,294]. Jest to szczególnie ciekawe, gdyż wiadomo, że NF-κB pośrednio uczestniczy w procesach nocycepcji poprzez kontrolę ekspresji wielu mediatorów sprzyjających wystąpieniu nadwrażliwości, których poziom wzrasta po uszkodzeniu nerwów[295–297]. Poprzednie badania naszego zespołu wykazały, że hamowanie NF-κB za pomocą partenolidu prowadzi do zmniejszenia nadwrażliwości u szczurów po podwiązaniu nerwu kulszowego[97]. Może to tłumaczyć dlaczego podpajęczynówkowe podanie peiminy, inhibitora zarówno MAPK jak i NF-κB, skutkowało w naszych eksperymentach wyraźnym efektem przeciwbólowym **Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2023**[171]. Mimo że nadal trwają badania nad właściwościami biologicznymi peiminy, jej działanie prozdrowotne znane jest od dawna, zwłaszcza w tradycyjnej medycynie chińskiej. Związek ten wyizolowano z roślin z rodzaju szachownica (*Fritillaria sp.*), stosowanych jako środki przeciwzapalne i przeciwbólowe[202]. Niedawne badania *in vitro* sugerują, że peimina może również blokować kanały sodowe Nav1.7 oraz potasowe Kv1.3[202], co może stanowić mechanizm odpowiedzialny za jej działanie analgetyczne w naszych badaniach w modelu neuropatii. Niestety literatura dotycząca właściwości biologicznych peiminy nadal jest uboga, jednak najnowsze dane wskazują także na jej wysoki potencjał w hamowaniu wzrostu komórek glejaka wielopostaciowego oraz indukcji apoptozy w komórkach raka piersi[298,299]. Ponadto, co szczególnie ważne w kontekście bólu neuropatycznego, w badaniach *in vitro* przeprowadzonych na linii komórkowej BV2 wykazano, że peimina sprzyja polaryzacji

mikrogleju w kierunku fenotypu M2[300], co również może mieć znaczenie dla jej efektów przeciwbólowych, jednak wymaga to dalszej weryfikacji.

Kolejną wykorzystaną przez nas substancją modulującą MAPK i hamującą NF-κB jest fisetyna, flawonoid występujący powszechnie w wielu owocach i warzywach[301]. Wykazaliśmy, że związek ten wywołuje działanie analgetyczne po jednorazowym podpajęczynówkowym podaniu u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego ***Ciapała i wsp., Int J Mol Sci, 2023***[171]. Nasze wyniki są zgodne z obserwacjami uzyskanymi w 2015 roku przez zespół Zhao, który udowodnił, że wielokrotne doustne podania fisetyny skutecznie obniżają nadwrażliwość na bodźce termiczne w tym samym modelu neuropatii[201]. Co więcej, wykazano, że fisetyna podawana tą drogą może wykazywać korzystne efekty również w modelu neuropatii cukrzycowej[302]. Choć uzyskane efekty behawioralne są spójne we wszystkich eksperymentach, mechanizm działania fisetyny nadal wymaga doprecyzowania. Dowiedziono, że może w nim uczestniczyć system serotoninergiczny, gdyż podanie prekursora serotoniny, 5-hydroksytryptofanu, wzmacnia obserwowane działanie przeciwbólowe fisetyny, natomiast zastosowanie antagonisty receptora 5-HT7 całkowicie je znosi[201]. Ponadto udokumentowano, że substancja ta wpływa również na szlak PI3K/AKT, który w neuropatii pełni dualistyczną rolę. Z jednej strony jego aktywacja w neuronach czuciowych i komórkach glejowych sprzyja sensytyzacji poprzez nasilenie sygnalizacji prozapalnej oraz plastyczności synaptycznej, z drugiej zaś, w określonych warunkach, uczestniczy w mechanizmach przeżycia i regeneracji neuronów[303,304]. W literaturze znajdują się rozbieżne doniesienia wskazujące, że fisetyna może zarówno aktywować[305,306], jak i hamować[307] tę kaskadę sygnałową. Co ważne, istnieją sprzeczne doniesienia wskazujące, że fisetyna powoduje aktywację lub hamowanie tej kaskady sygnałowej. Niemniej, badania *in vitro* jednoznacznie pokazują, że aktywacja PI3K w określonych warunkach może ograniczać produkcję mediatorów pronocyceptywnych, jednocześnie nasilając odpowiedź antynocyceptywną[308–311]. Warto nadmienić, że w 2019 roku wykazano, iż resweratrol poprzez aktywację szlaku PI3K/AKT łagodzi ból neuropatyczny[312]. W naszych eksperymentach po raz pierwszy pokazaliśmy, że selektywny aktywator PI3K, 740 Y-P, po jednorazowym podaniu podpajęczynówkowym zmniejsza nadwrażliwość zarówno na bodźce dotykowe jak i termiczne w neuropatii **Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci, 2023***[171]**.** Biorąc pod uwagę zarówno wyniki naszych badań, jaki i dane literaturowe wskazujące na silne właściwości przeciwzapalne, antyoksydacyjne i przeciwbólowe fisetyny[302,313,314], uważamy, że związek ten stanowi obiecujący kierunek dalszych badań behawioralnych i molekularnych w modelach neuropatii o różnej etiologii.

Spośród modulatorów MAPK testowanych w naszych badaniach najsilniejsze działanie przeciwbólowe po podaniu podpajęczynówkowym u myszy w modelu bólu neuropatycznego

wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego wykazywała astaksantyna **Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2023**[171]. Związek ten został po raz pierwszy zidentyfikowany jako naturalny barwnik w latach 30. XX wieku przez wybitnych biochemików, Richarda Kuhna i Edgara Ledera, którzy w 1931 roku zrewolucjonizowali chemię organiczną, reaktywując i udoskonalając metodę chromatografii kolumnowej do rozdzielania karotenoidów. Astaksantynę wyizolowano z muszli homara *Astacus gammarus* i przypisano do grupy ksantofili[315]. Obecnie jest produkowana zarówno naturalnie z hodowli mikroalg (*Haematococcus pluvialis*), jak i syntetycznie, znajdując zastosowanie jako składnik suplementów diety[315]. Zarówno Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. *European Food Safety Authority*) jak i amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*) uznały astaksantynę za bezpieczną do stosowania u ludzi[316,317]. Dotychczas opisano wiele korzystnych właściwości tej substancji, przede wszystkim związane z jej działaniem antyoksydacyjnym i przeciwzapalnym[318]. Badania przeprowadzone przez inny zespół, równolegle do naszych, wykazały, że dootrzewnowe podanie astaksantyny łagodzi ból neuropatyczny w modelu podwiązania nerwu rdzeniowego, a efekt ten powiązano z jej zdolnością hamowania ERK1/2, p38 i NF-κB[212]. Niemniej mechanizm działania astaksantyny wydaje się jednak bardziej złożony i wielokierunkowy. Zasugerowano jej pośredni wpływ na katabolizm tryptofanu, co potwierdza obserwacja, że astaksantyna odwraca zmiany w rdzeniu kręgowym wywołane podwiązaniem nerwu kulszowego, w tym wzrost stosunku kynurenina/tryptofan oraz spadek stosunku serotonina/tryptofan[203]. Niedawno pojawiły się także doniesienia wskazujące, że astaksantyna może działać jako aktywator Nrf2[319]. Zgodnie z dostępnymi danymi, aktywacja Nrf2 może przynosić korzystne efekty w bólu neuropatycznym, głównie poprzez redukcję stresu oksydacyjnego i dysfunkcji mitochondriów[320–322]. Nasze eksperymenty z zastosowaniem bardoksolonu metylu, będącego selektywnym aktywatorem Nrf2, wykazały, że substancja ta zmniejsza nadwrażliwość dotykową i termiczną u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego **Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2023**[171]. Wynik ten jest zgodny z doniesieniami innych autorów, którzy opisali podobne efekty tej substancji w modelu neuropatii cukrzycowej[323].

Istotnym aspektem przeprowadzonych przez nas badań była ocena wpływu testowanych modulatorów na analgezję wywołaną lekami opioidowymi **Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2023**[171]. W tych eksperymentach po raz kolejny niezwykle skuteczna okazała się być astaksantyna, która po pojedynczym podpajęczynówkowym podaniu z morfiną, buprenorfiną lub oksykodonem wywoływała lepsze efekty przeciwbólowe niż każdy z tych opioidów stosowany osobno. Co ciekawe, w analogicznym eksperymencie z zastosowaniem peiminy uzyskaliśmy podobne, choć słabsze efekty analgetyczne **Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2023**[171].

Uzyskane przez nas wyniki są zgodne z doniesieniami literaturowymi sugerującymi, że modulacja szlaków MAPK może wpływać na skuteczność opioidów. Wykazano bowiem, że hamowanie p38[324], ERK1/2[97,99] i JNK[325,326] wpływa korzystnie na analgezję morfinową w neuropatii. Podejrzewamy, że za wysoką efektywność astaksantyny może odpowiadać jej zdolność do aktywacji Nrf2, co zostanie szerzej omówione w dalszej części dyskusji. Warto jednak podkreślić, że w eksperymentach z zastosowaniem leków opioidowych selektywny aktywator Nrf2, bardoksolon metylu, wykazywał korzystne efekty. Kolejny z modulatorów MAPK, fisetyna, w podaniu łączonym z morfiną lub oksykodonem powodowała wyraźne obniżenie nadwrażliwości na bodźce dotykowe i termiczne, jednak nie wpływała na efekty analgetyczne buprenorfiny ani w teście von Frey ani zimnej płytki **Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2023**[171]. To, co prawdopodobnie odróżnia molekularny mechanizm działania fisetyny od astaksantyny i peiminy, to jej zdolność do aktywacji PI3K. W związku z tym przeprowadziliśmy dodatkowe badania z zastosowaniem aktywatora PI3K, w których wykazaliśmy, że 740 Y-P wywoływał silniejszy efekt analgetyczny w podaniach z lekami opioidowymi, ale jedynie w przypadku testu zimnej płytki. Wynik ten sugeruje, że aktywacja PI3K może mieć większe znaczenie w przypadku nadwrażliwości na bodziec termiczny niż dotykowy **Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2023**[171]**.** Jest to ciekawa obserwacja, wymagająca jednak dalszych badań, zwłaszcza w świetle innych doniesień sugerujących, że to blokada PI3K, a nie aktywacja, może osłabiać rozwój tolerancji morfinowej u myszy neuropatycznych[326,327]. Należy podkreślić, że najbardziej obiecujące efekty po podaniach podpajęczynówkowych uzyskaliśmy w przypadku astaksantyny, co potwierdziła również analiza ED_{50} (mediana dawki skutecznej) testowanych związków. Co więcej, jej zastosowanie w podaniach łączonych z lekami opioidowymi skutkowało najefektywniejszą poprawą obserwowanych efektów analgetycznych. Mając na uwadze, że astaksantyna ma zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg[328] oraz fakt, że obwodowe podanie leków lepiej odzwierciedla kliniczne schematy terapii przeciwbólowej, zdecydowaliśmy się na jej systemowe zastosowanie w dalszych eksperymentach, zakładając, że uzyskane wyniki mogą w przyszłości mieć istotne implikacje kliniczne.

Dowiedliśmy, że astaksantyna zmniejsza nadwrażliwość na bodziec dotykowy i termiczny również po podaniu dootrzewnowym, w podobnym stopniu u samców jak i u samic myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego **Ciapała i wsp., *Neurotherapeutics*, 2025**[173] oraz w modelu neuropatii cukrzycowej **Ciapała i wsp., *Pharmacol Rep*, 2024**[172]. Co szczególnie istotne, nasze eksperymenty dostarczyły pierwszych dowodów na to, że wielokrotne dootrzewnowe podania astaksantyny w skojarzeniu z morfiną skutecznie opóźniają rozwój tolerancji morfinowej, nie zaburzając przy tym koordynacji ruchowej zwierząt.

Warto podkreślić, że astaksantyna podawana przed uszkodzeniem nerwu kulszowego, a następnie w kolejnych dniach eksperymentu, sama wywoływała trwały i silny efekt przeciwbólowy. Ponadto jej podanie myszom, u których skuteczność morfiny po wielokrotnych podaniach uległa osłabieniu, również prowadziło do obniżenia nadwrażliwości **Ciapała i wsp., *Neurotherapeutics*, 2025**[173]. W modelu neuropatii cukrzycowej wykazaliśmy, że opóźnienie rozwoju tolerancji morfinowej przez astaksantynę nie jest aż tak wyraźne, natomiast nie zaobserwowaliśmy wystąpienia nadwrażliwości indukowanej morfiną. Astaksantyna nie zmieniała podwyższonego stężenia glukozy we krwi obserwowanego w przebiegu cukrzycy **Ciapała i wsp., *Pharmacol Rep*, 2024**[172]. Należy zaznaczyć, że dostępne dane literaturowe wskazują na neuroprotekcyjne działanie astaksantyny w modelach urazu rdzenia kręgowego i mózgu[329–331]. Co więcej, udowodniono, że substancja ta łagodzi zachowania depresyjne u zwierząt[203,332], co ma istotne znaczenie kliniczne, ponieważ pacjenci cierpiący z powodu bólu neuropatycznego często zgłaszają współwystępujące zaburzenia nastroju[333,334].

Celem naszych badań przeprowadzonych w modelu podwiązania nerwu kulszowego było także wyjaśnienie mechanizmów molekularnych, dzięki którym astaksantyna wykazuje skuteczność w łagodzeniu bólu neuropatycznego. Skupiliśmy się w szczególności na weryfikacji hipotez dotychczas przedstawionych w dostępnej literaturze. Badania *in vitro* wykazały, że astaksantyna może hamować polaryzację mikrogleju w kierunku fenotypu M1 w hodowli pierwotnej oraz w linii komórkowej BV2[335–337]. Jest to szczególnie istotne w kontekście neuropatii, gdyż potwierdzono, że komórki te są silnie aktywowane w rdzeniu kręgowym po uszkodzeniu nerwu, przybierając fenotyp M1[25,83]. Nasze badania potwierdziły, że po podwiązaniu nerwu kulszowego u myszy dochodzi do zwiększenia poziomu markera mikrogleju/makrofagów w rdzeniu kręgowym, co jest zgodne z dotychczasowymi doniesieniami[37,41,42]. Natomiast wielokrotne podania astaksantyny nie wpłynęły na poziom ekspresji markerów zarówno mikrogleju/makrofagów jak i astrocytów w 9 dniu po uszkodzeniu nerwu **Ciapała i wsp., *Neurotherapeutics*, 2025**[173]. Wynik ten wskazuje, że wbrew wcześniejszym doniesieniom[212] modulacja tych komórek może nie stanowić głównego mechanizmu działania przeciwbólowego astaksantyny w schemacie podań zastosowanym w naszych eksperymentach. Nie wyklucza to jednak udziału specyficznych fenotypów komórek – M1/A1 lub M2/A2 – których analizę planujemy w kolejnych badaniach.

Dotychczasowe dane literaturowe wskazują, że astaksantyna może hamować MAPK[212,338–340], które odgrywają istotną rolę w wewnątrzkomórkowej modulacji odpowiedzi nocyceptywnej[25,83,141]. Udowodniono również, że w modelu podwiązania nerwu rdzeniowego jej działanie przeciwbólowe wiąże się z hamowaniem aktywacji p38 i ERK1/2[212]. Dlatego

w naszych eksperymentach postanowiliśmy sprawdzić, czy wielokrotne dootrzewnowe podania astaksantyny wpływają na poziom fosforylacji p38, ERK1/2, JNK oraz NF-κB w rdzeniu kręgowym. Nie zaobserwowaliśmy zmian, jednak badania przeprowadziliśmy wyłącznie w dniu 9, a zmiany w fosforylacji MAPK mogą być czasowo zmienne, zatem ich rola w działaniu przeciwbólowym astaksantyny wymaga dalszej weryfikacji.

Mając na uwadze najnowszą literaturę sugerującą możliwy wpływ astaksantyny na czynnik transkrypcyjny Nrf2 w badaniach *in vitro*, postanowiliśmy eksperymentalnie zweryfikować naszą hipotezę, że aktywacja właśnie tej ścieżki sygnałowej może odpowiadać za korzystne działanie astaksantyny w neuropatii. Jak wykazano wcześniej, aktywacja Nrf2 może prowadzić do indukcji transkrypcji licznych enzymów antyoksydacyjnych, które łagodzą ból w zwierzęcych modelach neuropatii[211,320–322,341]. Również w naszych badaniach dowiedliśmy, że podany podpajęczynówkowo bardoksolon metylu, aktywator Nrf2, wykazuje efekty analgetyczne **Ciapała i wsp., *Int J Mol Sci*, 2023**[171]. Kolejne przeprowadzone eksperymenty dowiodły, że Nrf2 odgrywa kluczową rolę w mediowaniu właściwości przeciwbólowych astaksantyny. Testy behawioralne pokazały, że podpajęczynówkowe podanie astaksantyny znacząco łagodzi nadwrażliwość zarówno na bodźce dotykowe, jak i termiczne wywołaną podwiązaniem nerwu kulszowego, przy czym efekt ten jest osłabiany przez inhibitor Nrf2, trigonellinę. Po raz pierwszy opisaliśmy zatem bezpośrednie zaangażowanie tego czynnika transkrypcyjnego w działanie przeciwbólowe astaksantyny **Ciapała i wsp., *Neurotherapeutics*, 2025**[173]. Ponadto uzyskane wyniki pozwalają nam wysnuć hipotezę, że poprzez wpływ na Nrf2 astaksantyna może również wykazywać lepsze działanie analgetyczne w podaniach z lekami opioidowymi.

Podczas gdy aktywacja szlaku Nrf2 chroni neurony i komórki glejowe przed stresem oksydacyjnym oraz nadmierną produkcją cytokin prozapalnych[211], kolejnym kluczowym mechanizmem modulującym ból neuropatyczny jest aktywacja receptorów NMDA w rdzeniu kręgowym, które odpowiadają za centralną sensytyzację i wzmocnienie transmisji sygnałów bólowych[216,342]. Co ciekawe, niedawno wykazano w badaniach dokowania molekularnego *in silico*, że astaksantyna wpasowuje się w kieszeń wiążącą podjednostki NR2B receptora NMDA, która stanowi kluczowy element szlaku sygnalizacji nocyceptywnej[215]. Zaobserwowany przez nas w badaniach biochemicznych wyraźny spadek ekspresji białka NR2B w rdzeniu kręgowym po podaniu astaksantyny skłonił nas do dalszej weryfikacji tego mechanizmu z wykorzystaniem podejścia farmakologicznego **Ciapała i wsp., *Neurotherapeutics*, 2025**[173]. Należy jednak zaznaczyć, że badanie funkcji NR2B *in vivo* jest ograniczone ze względu na brak dostępnego komercyjnie selektywnego agonisty tej podjednostki. Z tego powodu, a także mając na uwadze nasze wcześniejsze eksperymenty

dotyczące roli szlaku kynureninowego w neuropatii, zastosowaliśmy kwas chinolinowy, endogennego agonistę receptora NMDA, wiążącego się z podjednostkami NR2B i NR2A[62]. Co istotne, kwas chinolinowy jest syntetyzowany głównie przez zaktywowane komórki mikrogleju w rdzeniu kręgowym w trakcie rozwoju bólu neuropatycznego[62]. W warunkach fizjologicznych jego stężenie w układzie nerwowym zazwyczaj nie przekracza 100 nM, natomiast w stanach patologicznych może znacznie wzrosnąć, osiągając poziom 500–1200 nM[343]. Ponadto niedawno przeprowadzone badanie obejmujące ponad 17 000 pacjentów wykazało, że kwas chinolinowy jest jednym z najczęściej podwyższonych markerów biochemicznych związanych z wystąpieniem przewlekłych objawów bólowych[344]. Nasze eksperymenty dostarczyły pierwszych dowodów na to, że podpajęczynówkowe podanie astaksantyny przed kwasem chinolinowym u myszy powoduje zahamowanie rozwoju nadwrażliwości na bodźce dotykowe i termiczne, co jednoznacznie potwierdza udział receptora NMDA w mechanizmie przeciwbólowego działania astaksantyny **Ciapała i wsp., *Neurotherapeutics*, 2025**[173]. Dane literaturowe potwierdzają, że farmakologiczne blokowanie podjednostki NR2B prowadzi do silnych efektów przeciwbólowych w modelach neuropatii[345–347]. Co więcej, właściwości analgetyczne antagonistów receptora NMDA takich jak ketamina, memantyna czy dekstrometorfan są aktualnie przedmiotem licznych badań eksperymentalnych i klinicznych[348,349]. Ketamina podawana w dawkach subanestetycznych jest z powodzeniem wykorzystywana w leczeniu bólu u ludzi, a współcześnie znajduje zastosowanie także w terapii bólu neuropatycznego, również jako koanalgetyk[350–352]. Ponadto wykazano, że blokada NR2B przez antagonistę, Ro 25-6981, ogranicza rozwój tolerancji na morfinę, dlatego uważamy, że to poprzez blokowanie NR2B astaksantyna korzystnie wpływa na analgezję morfinową także w naszych eksperymentach[353]. Jest to szczególnie interesujące w kontekście wyników, jakie uzyskaliśmy w badaniach z wykorzystaniem modelu neuropatii cukrzycowej. Wykazaliśmy, że podawanie astaksantyny w skojarzeniu z morfiną wywołuje silniejszy efekt przeciwbólowy oraz opóźnia rozwój tolerancji morfinowej. Ponadto u myszy otrzymujących samą morfinę zaobserwowaliśmy wystąpienie nadwrażliwości na bodźce dotykowe i termiczne, odpowiadającej zjawisku OIH, a czego nie zanotowaliśmy w grupie zwierząt otrzymujących astaksantynę z morfiną **Ciapała i wsp., *Pharmacol Rep*, 2024**[172]. Tolerancja morfinowa i OIH to odrębne, choć częściowo powiązane, złożone zjawiska wynikające z długotrwałego stosowania opioidów. Tolerancja polega na stopniowym zmniejszaniu się skuteczności przeciwbólowej przy tej samej dawce leku, natomiast OIH to paradoksalne zwiększenie wrażliwości na ból wywołane samym lekiem opioidowym. W kontekście naszych badań warto zaznaczyć, że w mechanizmach obu zjawisk istotną rolę odgrywają receptory NMDA: ich nadmierna aktywacja w rdzeniu kręgowym prowadzi do centralnej sensytyzacji, co przyczynia

się zarówno do rozwoju OIH, jak i częściowo do tolerancji morfinowej poprzez wzrost transmisji glutaminergicznej i adaptacyjne zmiany w neuronach czuciowych[157]. Dotychczas wykazano w badaniach przedklinicznych, że antagonista receptora NMDA, MK-801, łagodzi objawy OIH[354,355].

Obecnie dostępne metody leczenia bólu neuropatycznego często charakteryzują się ograniczoną skutecznością oraz niekorzystnym profilem działań niepożądanych. W tym kontekście astaksantyna jest szczególnie obiecującą substancją o istotnym potencjale klinicznym. Przeprowadzone przez nas badania dowodzą, że wywiera ona długotrwały efekt przeciwbólowy w modelach bólu neuropatycznego, nie powodując zaburzeń motorycznych, a jednocześnie skutecznie opóźniając rozwój tolerancji morfinowej i OIH. Uzyskane wyniki po raz pierwszy wskazują na jej unikatowe właściwości, w tym działanie poprzez aktywację szlaku sygnałowego Nrf2, jak i blokowanie podjednostki NR2B receptora NMDA, co umożliwia jej szerokie spektrum działania. Co istotne, astaksantyna jest związkiem dopuszczonym do stosowania jako suplement diety o dobrze udokumentowanym profilu bezpieczeństwa. Ponadto niedawno wykazano, że preparaty złożone, które zawierają astaksantynę, takie jak PeaNoc XL[356] oraz FlexPro MD®[357] skutecznie redukują ból i sztywność stawów u ludzi.

Podsumowując, badania przeprowadzone w ramach niniejszej dysertacji dostarczyły nowych informacji na temat mechanizmów rozwoju bólu neuropatycznego oraz potencjalnych możliwości jego uśmierzania dzięki farmakologicznej modulacji szlaku kynureninowego oraz wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Uzyskane przez nas rezultaty podkreślają również niezwykłą złożoność zjawiska jakim jest ból neuropatyczny, ukazując jednocześnie jak wiele jego aspektów pozostaje nadal nieznanych. Wyniki badań wskazują, że związki modulujące szlak kynureninowy (UPF648, L-kynurenina, 1-metyl-D-tryptofan) oraz substancje pochodzenia roślinnego (peimina, fisetyna, astaksantyna) wykazują efekty przeciwbólowe, przy czym ich podawanie w połączeniu z lekami opioidowymi jest korzystne, ponieważ prowadzi do większej redukcji nadwrażliwości. Udowodniliśmy również, że astaksantyna podawana obwodowo wywołuje działanie analgetyczne w neuropatii o różnej etiologii, jednocześnie nie powodując deficytów motorycznych u zwierząt, co jest szczególnie ważne z perspektywy translacyjnej. Poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów leżących u podstaw bólu neuropatycznego może w przyszłości przyczynić się do opracowania nowych, bardziej skutecznych strategii terapeutycznych, które – mamy nadzieję – przyniosą ulgę milionom pacjentów cierpiących na tę wyniszczającą dolegliwość.

6. PODSUMOWANIE NAJWAŻNIEJSZYCH WYNIKÓW

Ad. 1. Wykazano, że farmakologiczna modulacja szlaku kynureninowego istotnie wpływa na procesy nocycepcji w mysim modelu podwiązania nerwu kulszowego:

a) **L-kynurenina** (centralny metabolit szlaku kinureninowego i substrat KMO), podana zarówno drogą podpajęczynówkową jak i dożylną, obniża nadwrażliwość na bodźce dotykowe i termiczne, oraz wykazuje lepsze efekty przeciwbólowe po łącznym podaniu z **morfiną, buprenorfiną i oksykodonem,**
b) **1-metyl-D-tryptofan** (inhibitor IDO) i **UPF648** (inhibitor KMO), podane jednorazowo podpajęczynówkowo, obniżają nadwrażliwość, a ponadto inhibitor KMO wykazuje lepsze efekty przeciwbólowe w łączonym podaniu zarówno z **morfiną** jak i **buprenorfiną,**
c) łączne podanie **UPF648** z **L-kynureniną** efektywniej hamuje nadwrażliwość bólową,
d) **minocyklina** (hamująca aktywację/napływ/proliferację mikrogleju i makrofagów) podana przed **L-kynureniną** przyczynia się do uzyskania lepszego efektu przeciwbólowego.

Ad. 2. Uzyskane wyniki dostarczyły nowych informacji wskazujących, że modulacja wybranych szlaków sygnałowych korzystnie wpływa na procesy nocycepcji w przebiegu bólu neuropatycznego:

a) **peimina** (inhibitor MAPK/NF-κB), **fisetyna** (inhibitor MAPK/aktywator PI3K), **740 Y-P** (selektywny aktywator PI3K), **astaksantyna** (inhibitor MAPK/aktywator Nrf2) i **bardoksolon metylu** (selektywny aktywator Nrf2), ale nie **artemizynina** (inhibitor MAPK/aktywator NF-κB), podawane podpajęczynówkowo, obniżają nadwrażliwość na bodziec dotykowy i termiczny u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego,
b) **astaksantyna** i **bardoksolon metylu**, jako jedyne zastosowane związki wywołują lepsze efekty przeciwbólowe w podaniu łącznie z **morfiną, buprenorfiną** jak i **oksykodonem** po podwiązaniu nerwu kulszowego,
c) **astaksantyna** po jednorazowym dootrzewnowym podaniu powoduje uśmierzenie bólu w podobnym stopniu u samców i samic, zarówno w mysim modelu uszkodzenia nerwu kulszowego, jak i w neuropatii cukrzycowej. Ponadto, podawana wielokrotnie dootrzewnowo zapewnia długotrwałą ulgę w bólu w porównaniu z **morfiną**, a także opóźnia rozwój tolerancji morfinowej.

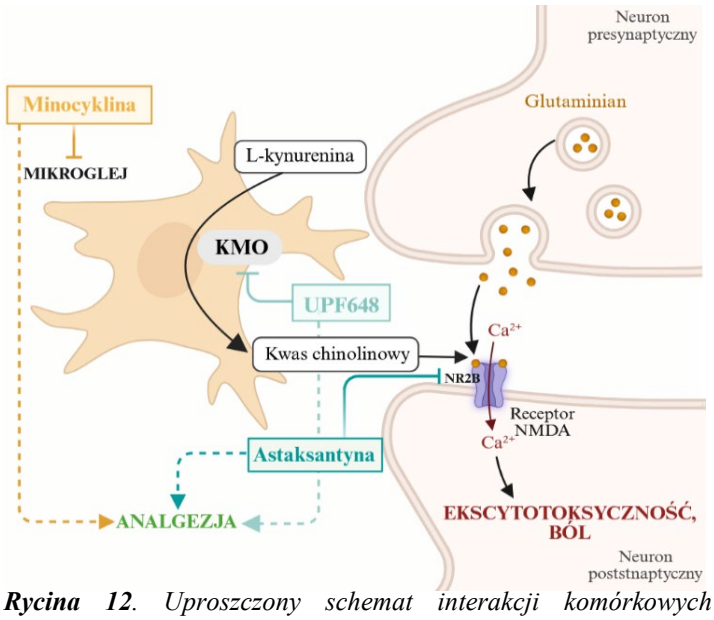
Ad. 3. Przeprowadzone badania pozwoliły zidentyfikować dotychczas nieopisane potencjalne mechanizmy przeciwbólowego działania astaksantyny, wskazując na dwa istotne punkty uchwytu:

a) czynnik transkrypcyjny Nrf2 **- trigonellina** (selektywny inhibitor Nrf2) podana podpajęczynówkowo powoduje osłabienie efektywności przeciwbólowej **astaksantyny** w bólu neuropatycznym,
b) podjednostkę NR2B receptora NMDA **- astaksantyna** podana przed **kwasem chinolinowym** (agonista podjednostek NR2A/B receptora NMDA) powoduje zahamowanie wystąpienia nadwrażliwości na bodźce dotykowe i termiczne.

7. WNIOSKI KOŃCOWE

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, przedstawione w 4 pracach oryginalnych, wskazują, że dokładne poznanie roli zarówno szlaku kynureninowego jak i wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych w transmisji nocyceptywnej może w przyszłości stanowić cenne źródło wiedzy, wspierające rozwój nowych strategii farmakoterapii bólu neuropatycznego. Należy podkreślić, iż leczenie tego bólu nadal stanowi poważny problem zarówno dla pacjentów, jak i dla lekarzy. Przeprowadzone przez nas badania dowodzą, że szlak kynureninowy jest znacząco zaangażowany w utrzymywanie się objawów bólowych w neuropatii. Wykazaliśmy, że na poziomie rdzenia kręgowego u myszy po podwiązaniu nerwu kulszowego dochodzi do wzrostu ekspresji enzymu KMO, a jego farmakologiczne hamowanie poprzez UPF648 obniża nadwrażliwość na bodźce (**Rycina 12**). Podobne działanie wykazuje L-kynurenina, centralny metabolit szlaku, a jej zastosowanie w podaniach łączonych z lekami opioidowymi wzmacnia obserwowany efekt analgetyczny. Ponadto, po raz pierwszy udowodniliśmy, że hamowanie KMO z jednoczesnym podaniem jego substratu, L-kynureniny, jeszcze efektywniej uśmierza ból. Mechanizm tego zjawiska może obejmować zarówno zmniejszenie wytwarzania neurotoksycznego kwasu chinolinowego, jak i przesuniecie równowagi szlaku kynureninowego w kierunku syntezy neuroprotekcyjnego kwasu kynureninowego. Co więcej, wykazaliśmy, że zahamowanie aktywności, infiltracji, proliferacji mikrogleju/makrofagów przez minocyklinę również ma znaczenie dla przeciwbólowego działania L-kynureniny.

Dalsze badania nad rolą szlaku kynureninowego w neuropatii niewątpliwie są konieczne, szczególnie w odniesieniu do wciąż nie w pełni poznanych mechanizmów jego regulacji, w tym potencjalnych różnic płciowych w metabolizmie tryptofanu. W naszej opinii przyszłe eksperymenty powinny również uwzględniać rozwój i udoskonalanie narzędzi farmakologicznych umożliwiających modulację szlaku, a których dostępność pozostaje obecnie ograniczona. Postęp w tym obszarze mógłby w dłuższej perspektywie stworzyć podstawy do opracowania skuteczniejszej terapii bólu neuropatycznego.



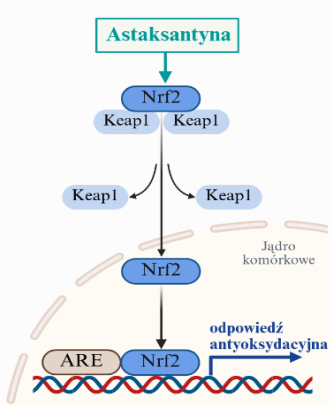
***Rycina 12**. Uproszczony schemat interakcji komórkowych w przebiegu neuropatii z zaznaczonymi wybranymi punktami uchwytu dla niektórych substancji badanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej.*
***Legenda:** ⊤-inhibitor, ↑ - aktywacja.*

W dalszych badaniach, mając na uwadze, że działanie przeciwbólowe minocykliny wiąże się również z jej wpływem na kinazę p38, a nowoczesna farmakoterapia zmierza w kierunku strategii wielokierunkowych, uznaliśmy za zasadne zweryfikowanie potencjału analgetycznego związków modulujących wybrane kinazy i czynniki transkrypcyjne, zwłaszcza tych, które mogą jednocześnie wpływać na kilka kluczowych czynników patofizjologicznych bólu neuropatycznego. Wyniki naszych badań, dowodzą, że trzy spośród przebadanych substancji pochodzenia roślinnego - peimina, fisetyna oraz astaksantyna - nie tylko wykazują właściwości przeciwbólowe, lecz także efektywniej obniżają nadwrażliwość w podaniach łączonych z lekami opioidowymi po podwiązaniu nerwu kulszowego (**Rycina 13**). Uzyskane dane sugerują, że poszukiwanie nowych zastosowań dla znanych substancji może być dobrym

	ERK	p38	JNK	PI3K	Nrf2	NF-κB	Leki opioidowe
Peimina	T	T	T	-	-	T	+
Fisetyna	T	-	-	↑	-	T	+
Astaksantyna	T	T	T	-	↑	-	+

Rycina 13. *Związki modulujące szlaki wewnątrzkomórkowe, które najskuteczniej hamowały nadwrażliwość na bodźce po podwiązaniu nerwu kulszowego oraz ich wpływ na efekty przeciwbólowe w podaniach z lekami opioidowymi.* ***Legenda:*** *T –hamowanie, ↑- aktywacja, - brak wpływu, +poprawa analgezji.*

kierunkiem w rozwoju farmakoterapii bólu neuropatycznego, podkreślając wyjątkowe działanie astaksantyny, która w naszych badaniach okazała się być najbardziej skuteczną spośród testowanych substancji. Co szczególnie istotne z perspektywy translacyjnej, dalsze eksperymenty wykazały, że także jej obwodowe podania zapewniają długotrwałą redukcję nadwrażliwości w modelach bólu o różnej etiologii, nie powodując jednocześnie deficytów motorycznych. Warto również podkreślić, że astaksantyna podawana obwodowo zapobiega rozwojowi tolerancji morfinowej, co czyni ją bardzo ciekawą substancją z klinicznego punktu widzenia. Uzyskane efekty behawioralne, uzupełnione naszymi analizami biochemicznymi przeprowadzonymi w modelu podwiązania nerwu kulszowego, wskazują, że jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za działanie przeciwbólowe astaksantyny jest aktywacja Nrf2 (**Rycina 14**). Rolę tego czynnika potwierdziliśmy w eksperymentach z zastosowaniem bardoksolonu metylu, co dowodzi, że aktywacja Nrf2 mogłaby stanowić obiecującą strategię terapeutyczną w neuropatii. Co szczególnie ciekawe, astaksantyna wpływa również na działanie kwasu chinolinowego, agonisty podjednostki NR2A/B receptora NMDA, a zarazem metabolitu końcowego szlaku kynureninowego (**Rycina 12**). Nasze badania dostarczają pierwszych dowodów na to, że podpajęczynówkowe podanie astaksantyny znosi pronocyceptywne działanie kwasu chinolinowego. Zgodność tych obserwacji i przeprowadzonej analizy biochemicznej z danymi literaturowymi oraz wynikami badań *in silico* wskazują na kluczową rolę podjednostki NR2B w mechanizmie działania przeciwbólowego astaksantyny. Biorąc pod uwagę, że selektywna blokada NR2B opóźnia rozwój tolerancji morfinowej, postulujemy, iż astaksantyna może korzystnie wpływać na przeciwbólowe działanie morfiny również poprzez ten mechanizm. W świetle dostępnych danych astaksantyna, podobnie do ketaminy, poprzez blokadę podjednostki NR2B receptora NMDA, może stanowić obiecującą strategię terapeutyczną w leczeniu bólu neuropatycznego, jednak dalsze badania przedkliniczne i kliniczne są niezbędne w celu pełnego wyjaśnienia jej złożonego mechanizmu działania. Warto zaznaczyć, że astaksantyna jest suplementem diety o znanym profilu bezpieczeństwa, a jej potencjalne zastosowanie terapeutyczne nie wiązałoby się z wysokimi kosztami opracowywania nowych leków. Co ważne, dwa ostatnie badania kliniczne dowodzą, że preparaty zawierające astaksantynę (PeaNoc XL, FlexPro MD®) efektywnie redukują ból w chorobie zwyrodnieniowej[357] i zapaleniu stawów[356] co dodatkowo podkreśla jej potencjał leczniczy. **Podsumowując, przeprowadzone badania dostarczają nowych, kompleksowych danych dotyczących mechanizmów rozwoju i farmakologicznej modulacji bólu neuropatycznego, wskazując jednocześnie na astaksantynę jako bardzo obiecującą substancję o właściwościach analgetycznych i to w neuropatii o różnej etiologii. Wyniki naszych badań stanowią istotny punkt wyjścia do dalszych badań translacyjnych, mających na celu ocenę terapeutycznego potencjału astaksantyny w praktyce klinicznej. Lepsze poznanie jej działania mogłoby umożliwić opracowanie nowych strategii leczenia bólu neuropatycznego, otwierając drogę do realnej poprawy jakości życia pacjentów dotkniętych tym przewlekłym schorzeniem.**



Rycina 14. *Wpływ astaksantyny na ścieżkę sygnalizacyjną czynnika transkrypcyjnego Nrf2.* ***Legenda:*** *↑ - aktywacja.*

8. PIŚMIENNICTWO

1. Raja SN, Carr DB, Cohen M, et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 2020;161(9):1976-1982. doi:10.1097/j.pain.0000000000001939
2. Kutafina E, Becker S, Namer B. Measuring pain and nociception: Through the glasses of a computational scientist. Transdisciplinary overview of methods. *Front Netw Physiol*. 2023;3:1099282. doi:10.3389/fnetp.2023.1099282
3. Mischkowski D, Palacios-Barrios EE, Banker L, Dildine TC, Atlas LY. Pain or nociception? Subjective experience mediates the effects of acute noxious heat on autonomic responses. *Pain*. 2018;159(4):699-711. doi:10.1097/j.pain.0000000000001132
4. Baliki MN, Apkarian AV. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. *Neuron*. 2015;87(3):474-491. doi:10.1016/J.NEURON.2015.06.005
5. Coghill RC. The Distributed Nociceptive System: A Framework for Understanding Pain. *Trends Neurosci*. 2020;43(10):780-794. doi:10.1016/j.tins.2020.07.004
6. Wordliczek J, Dobrogowski J. *Leczenie Bólu*.; 2022.
7. Karcz M, Abd-Elsayed A, Chakravarthy K, et al. Pathophysiology of Pain and Mechanisms of Neuromodulation: A Narrative Review (A Neuron Project). *J Pain Res*. 2024;17:3757-3790. doi:10.2147/JPR.S475351
8. Todd AJ. Nociceptive Circuitry in the Spinal Cord. In: *Encyclopedia of Pain*. Springer Berlin Heidelberg; 2007:1358-1362. doi:10.1007/978-3-540-29805-2_2748
9. D'Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth*. 2008;101(1):8-16. doi:10.1093/bja/aen088
10. Rang H, Dale M, Ritter J, Flower R, Henderson G. *Rang i Dale Farmakologia*. wyd. 9.; 2021.
11. Schnitzler A, Ploner M. Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. *J Clin Neurophysiol*. 2000;17(6):592-603. doi:10.1097/00004691-200011000-00005
12. Adamczyk WM, Skalski J, Nowak D, et al. Rozsiany system nocycepcji fizjologicznym podłożem odczuwania bólu u ludzi. *BÓL*. 2023;24(3):9-14. doi:10.5604/01.3001.0053.9493
13. Nowak D, Adamczyk WM. Ból nocyplastyczny jako potencjalny mechanizm bólu? *BÓL*. 2025;26(2):33-39. doi:10.5604/01.3001.0055.2352
14. Stretanski MF, Kopitnik NL, Matha A, Conermann T. Chronic Pain. *Chronic Dis An Encycl Causes, Eff Treat Vol 1 A-H/ Vol 2 I-Z*. Published online September 28, 2025:599-601. doi:10.1542/9781581109689-part01-ch40
15. Finnerup NB, Kuner R, Jensen TS. Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment. *Physiol Rev*. 2021;101(1):259-301. doi:10.1152/physrev.00045.2019
16. van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain*. 2014;155(4):654-662. doi:10.1016/j.pain.2013.11.013
17. Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol*. 2014;13(9):924-935. doi:10.1016/S1474-4422(14)70102-4
18. Lee-Kubli CA, Calcutt NA. Painful neuropathy: Mechanisms. *Handb Clin Neurol*. 2014;126:533-557. doi:10.1016/B978-0-444-53480-4.00034-5
19. Mauermann ML, Staff NP. Peripheral Neuropathy. *JAMA*. 2026;335(3):255. doi:10.1001/jama.2025.19400
20. Standl E, Khunti K, Hansen TB, Schnell O. The global epidemics of diabetes in the 21st century: Current situation and perspectives. *Eur J Prev Cardiol*. 2019;26(2_suppl):7-14. doi:10.1177/2047487319881021
21. Szczyrba S, Kozera G, Bieniaszewski L, Nyka WM. Neuropatia cukrzycowa - patogeneza, rozpoznawanie, zapobieganie, leczenie. *Forum Med Rodz*. 2010;4(5):339-355. doi:10.5603/fmr.10059
22. Salis F, Sardo S, Finco G, Gessa GL, Franconi F, Agabio R. Sex-Gender Differences Are Completely Neglected in Treatments for Neuropathic Pain. *Pharmaceuticals*. 2024;17(7):838. doi:10.3390/PH17070838
23. Meacham K, Shepherd A, Mohapatra DP, Haroutounian S. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Curr Pain Headache Rep*. 2017;21(6):28. doi:10.1007/s11916-017-0629-5

24. Wordliczek J, Zajączkowska R. Ból neuropatyczny — patomechanizm. *Palliat Med Pract*. 2014;8(2):61-65. doi:10.5603/pmp.38626.
25. Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B. Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2013;716(1-3):106-119. doi:10.1016/j.ejphar.2013.01.072
26. Watkins LR, Hutchinson MR, Ledeboer A, Wieseler-Frank J, Milligan ED, Maier SF. Glia as the "bad guys": Implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain Behav Immun*. 2007;21(2):131-146. doi:10.1016/j.bbi.2006.10.011
27. Zhuo M, Wu G, Wu LJ. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. *Mol Brain*. 2011;4(1):31. doi:10.1186/1756-6606-4-31
28. Inoue K, Tsuda M. Microglia and neuropathic pain. *Glia*. 2009;57(14):1469-1479. doi:10.1002/glia.20871
29. Pawlik K, Piotrowska A, Kwiatkowski K, et al. The blockade of CC chemokine receptor type 1 influences the level of nociceptive factors and enhances opioid analgesic potency in a rat model of neuropathic pain. *Immunology*. Published online February 5, 2020:imm.13172. doi:10.1111/imm.13172
30. Jurga AM, Piotrowska A, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Blockade of P2X4 Receptors Inhibits Neuropathic Pain-Related Behavior by Preventing MMP-9 Activation and, Consequently, Pronociceptive Interleukin Release in a Rat Model. *Front Pharmacol*. 2017;8(FEB):245214. doi:10.3389/fphar.2017.00048
31. Kwiatkowski K, Piotrowska A, Rojewska E, Makuch W, Mika J. The RS504393 Influences the Level of Nociceptive Factors and Enhances Opioid Analgesic Potency in Neuropathic Rats. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2017;12(3):402-419. doi:10.1007/s11481-017-9729-6
32. Mika J, Wawrzczak-Bargiela A, Osikowicz M, Makuch W, Przewlocka B. Attenuation of morphine tolerance by minocycline and pentoxifylline in naive and neuropathic mice. *Brain Behav Immun*. 2009;23(1):75-84. doi:10.1016/j.bbi.2008.07.005
33. Rojewska E, Piotrowska A, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Pharmacological kynurenine 3-monooxygenase enzyme inhibition significantly reduces neuropathic pain in a rat model. *Neuropharmacology*. 2016;102:80-91. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.10.040
34. Kwiatkowski K, Piotrowska A, Rojewska E, et al. Beneficial properties of maraviroc on neuropathic pain development and opioid effectiveness in rats. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2016;64:68-78. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.07.005
35. Milligan ED, Zapata V, Chacur M, et al. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur J Neurosci*. 2004;20(9):2294-2302. doi:10.1111/J.1460-9568.2004.03709.X
36. Zychowska M, Rojewska E, Piotrowska A, Kreiner G, Nalepa I, Mika J. Spinal CCL1/CCR8 signaling interplay as a potential therapeutic target – Evidence from a mouse diabetic neuropathy model. *Int Immunopharmacol*. 2017;52:261-271. doi:10.1016/j.intimp.2017.09.021
37. Ciechanowska A, Rojewska E, Piotrowska A, et al. New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies. *Front Immunol*. 2022;13:1058204. doi:10.3389/fimmu.2022.1058204
38. Zychowska M, Rojewska E, Piotrowska A, Kreiner G, Mika J. Microglial Inhibition Influences XCL1/XCR1 Expression and Causes Analgesic Effects in a Mouse Model of Diabetic Neuropathy. *Anesthesiology*. 2016;125(3):573-589. doi:10.1097/ALN.0000000000001219
39. Kwiatkowski K, Popiolek-Barczyk K, Piotrowska A, et al. Chemokines CCL2 and CCL7, but not CCL12, play a significant role in the development of pain-related behavior and opioid-induced analgesia. *Cytokine*. 2019;119:202-213. doi:10.1016/J.CYTO.2019.03.007
40. Rojewska E, Zychowska M, Piotrowska A, Kreiner G, Nalepa I, Mika J. Involvement of Macrophage Inflammatory Protein-1 Family Members in the Development of Diabetic Neuropathy and Their Contribution to Effectiveness of Morphine. *Front Immunol*. 2018;9:494. doi:10.3389/fimmu.2018.00494
41. Pawlik K, Ciapała K, Ciechanowska A, Kwiatkowski K, Mika J. Pharmacological Evidence of the Important Roles of CCR1 and CCR3 and Their Endogenous Ligands CCL2/7/8 in Hypersensitivity Based on a Murine Model of Neuropathic Pain. *Cells*. 2022;12(1):98. doi:10.3390/cells12010098

42. Bogacka J, Ciapała K, Pawlik K, et al. CCR4 Antagonist (C021) Administration Diminishes Hypersensitivity and Enhances the Analgesic Potency of Morphine and Buprenorphine in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Front Immunol*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.01241
43. Piotrowska A, Rojewska E, Pawlik K, et al. Pharmacological blockade of CXCR3 by (±)-NBI-74330 reduces neuropathic pain and enhances opioid effectiveness - Evidence from in vivo and in vitro studies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2018;1864(10):3418-3437. doi:10.1016/j.bbadis.2018.07.032
44. Piotrowska A, Rojewska E, Pawlik K, et al. Pharmacological Blockade of Spinal CXCL3/CXCR2 Signaling by NVP CXCR2 20, a Selective CXCR2 Antagonist, Reduces Neuropathic Pain Following Peripheral Nerve Injury. *Front Immunol*. 2019;10:2198. doi:10.3389/fimmu.2019.02198
45. Luo X, Tai WL, Sun L, et al. Crosstalk between astrocytic CXCL12 and microglial CXCR4 contributes to the development of neuropathic pain. *Mol Pain*. 2016;12. doi:10.1177/1744806916636385
46. Rojewska E, Ciapała K, Mika J. Kynurenic acid and zaprinast diminished CXCL17-evoked pain-related behaviour and enhanced morphine analgesia in a mouse neuropathic pain model. *Pharmacol Reports*. 2019;71(1):139-148. doi:10.1016/j.pharep.2018.10.002
47. Zhang T, Zhang M, Cui S, et al. The core of maintaining neuropathic pain: Crosstalk between glial cells and neurons (neural cell crosstalk at spinal cord). *Brain Behav*. 2023;13(2):e2868. doi:10.1002/brb3.2868
48. Inoue K, Tsuda M. Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Neurosci*. 2018;19(3):138-152. doi:10.1038/nrn.2018.2
49. Chen G, Zhang YQ, Qadri YJ, Serhan CN, Ji RR. Microglia in Pain: Detrimental and Protective Roles in Pathogenesis and Resolution of Pain. *Neuron*. 2018;100(6):1292-1311. doi:10.1016/j.neuron.2018.11.009
50. Pawlik K, Mika J. Targeting Members of the Chemokine Family as a Novel Approach to Treating Neuropathic Pain. *Molecules*. 2023;28(15):5766. doi:10.3390/molecules28155766
51. Gao YJ, Ji RR. *Targeting Astrocyte Signaling for Chronic Pain*.
52. Li X, Huang Y, Bai J. Spinal astrocytes involved in the pathogenesis and treatment of neuropathic pain. *Front Cell Neurosci*. 2025;19:1547524. doi:10.3389/fncel.2025.1547524
53. Li T, Chen X, Zhang C, Zhang Y, Yao W. An update on reactive astrocytes in chronic pain. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):140. doi:10.1186/S12974-019-1524-2
54. Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B, et al. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*. 2022;110(21):3458-3483. doi:10.1016/j.neuron.2022.10.020
55. Escartin C, Galea E, Lakatos A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci 2021 243*. 2021;24(3):312-325. doi:10.1038/s41593-020-00783-4
56. Santos DE, Silva Lima SA, Moreira LS, Lima Costa S, de Sampaio Schitine C. New perspectives on heterogeneity in astrocyte reactivity in neuroinflammation. *Brain, Behav Immun - Heal*. 2025;47:100948. doi:10.1016/j.bbih.2025.100948
57. Oxenkrug GF. Genetic and Hormonal Regulation of Tryptophan-Kynurenine Metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1122(1):35-49. doi:10.1196/annals.1403.003
58. Schwarcz R, Stone TW. The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology*. 2017;112:237-247. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.08.003
59. Savitz J. The kynurenine pathway: a finger in every pie. *Mol Psychiatry*. 2020;25(1):131-147. doi:10.1038/s41380-019-0414-4
60. Vécsei L, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(1):64-82. doi:10.1038/nrd3793
61. Stone TW, Clanchy FIL, Huang YS, Chiang NY, Darlington LG, Williams RO. An integrated cytokine and kynurenine network as the basis of neuroimmune communication. *Front Neurosci*. 2022;16:1002004. doi:10.3389/fnins.2022.1002004
62. Guillemin GJ. Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J*. 2012;279(8):1356-1365. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08485.x
63. Santamaría A, Ríos C. MK-801, an N-methyl-d-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett*. 1993;159(1-2):51-54. doi:10.1016/0304-3940(93)90796-N

64. Perkins MN, Stone TW. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res*. 1982;247(1):184-187. doi:10.1016/0006-8993(82)91048-4
65. Birch PJ, Grossman CJ, Hayes AG. Kynurenic acid antagonises responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor. *Eur J Pharmacol*. 1988;154(1):85-87. doi:10.1016/0014-2999(88)90367-6
66. Carpenedo R, Chiarugi A, Russi P, et al. Inhibitors of kynurenine hydroxylase and kynureninase increase cerebral formation of kynurenate and have sedative and anticonvulsant activities. *Neuroscience*. 1994;61(2):237-244. doi:10.1016/0306-4522(94)90227-5
67. Vamos E, Pardutz A, Klivenyi P, Toldi J. The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: Possibilities for neuroprotection. *J Neurol Sci*. 2009;283(1-2):21-27. doi:10.1016/J.JNS.2009.02.326
68. Foster AC, Vezzani A, French ED, Schwarcz R. Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci Lett*. 1984;48(3):273-278. doi:10.1016/0304-3940(84)90050-8
69. Peyrot F, Ducrocq C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res*. 2008;45(3):235-246. doi:10.1111/j.1600-079X.2008.00580.x
70. Reyes Ocampo J, Lugo Huitrón R, González-Esquivel D, et al. Kynurenines with neuroactive and redox properties: relevance to aging and brain diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:646909. doi:10.1155/2014/646909
71. Song H, Park H, Kim YS, et al. l-Kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(8):932-938. doi:10.1016/j.intimp.2011.02.005
72. Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 3-Hydroxykynurenine, an Endogenous Oxidative Stress Generator, Causes Neuronal Cell Death with Apoptotic Features and Region Selectivity. *J Neurochem*. 1998;70(1):299-307. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70010299.x
73. Cuartero MI, Ballesteros I, de la Parra J, et al. L-Kynurenine/Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway Mediates Brain Damage After Experimental Stroke. *Circulation*. 2014;130(23):2040-2051. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011394
74. Zádori D, Klivényi P, Vámos E, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L. Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies. *J Neural Transm*. 2009;116(11):1403-1409. doi:10.1007/s00702-009-0263-4
75. Cuartero MI, de la Parra J, García-Culebras A, Ballesteros I, Lizasoain I, Moro MÁ. The Kynurenine Pathway in the Acute and Chronic Phases of Cerebral Ischemia. *Curr Pharm Des*. 2016;22(8):1060-1073. Accessed March 29, 2019. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25248805
76. Fujigaki H, Yamamoto Y, Saito K. L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: Focus on cell type differences. *Neuropharmacology*. 2017;112:264-274. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.01.011
77. Fejes A, Pardutz A, Toldi J, Vecsei L. Kynurenine Metabolites and Migraine: Experimental Studies and Therapeutic Perspectives. *Curr Neuropharmacol*. 2011;9(2):376-387. doi:10.2174/157015911795596621
78. Mecs L, Tuboly G, Nagy E, Benedek G, Horvath G. The Peripheral Antinociceptive Effects of Endomorphin-1 and Kynurenic Acid in the Rat Inflamed Joint Model. *Anesth Analg*. 2009;109(4):1297-1304. doi:10.1213/ane.0b013e3181b21c5e
79. Rojewska E, Ciapała K, Piotrowska A, Makuch W, Mika J. Pharmacological Inhibition of Indoleamine 2,3-Dioxygenase-2 and Kynurenine 3-Monooxygenase, Enzymes of the Kynurenine Pathway, Significantly Diminishes Neuropathic Pain in a Rat Model. *Front Pharmacol*. 2018;9:724. doi:10.3389/fphar.2018.00724
80. Ciapała K, Mika J, Rojewska E. The Kynurenine Pathway as a Potential Target for Neuropathic Pain Therapy Design: From Basic Research to Clinical Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2021;22(20). doi:10.3390/IJMS222011055
81. Hucho T, Levine JD. Signaling Pathways in Sensitization: Toward a Nociceptor Cell Biology. *Neuron*. 2007;55(3):365-376. doi:10.1016/j.neuron.2007.07.008
82. Cheng JK, Ji RR. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res*. 2008;33(10):1970. doi:10.1007/S11064-008-9711-Z

83. Popiolek-Barczyk K, Mika J. Targeting the Microglial Signaling Pathways: New Insights in the Modulation of Neuropathic Pain. *Curr Med Chem*. 2016;23(26):2908-2928. Accessed May 29, 2018. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27281131
84. Ji RR, Suter MR. p38 MAPK, Microglial Signaling, and Neuropathic Pain. *Mol Pain*. 2007;3:33. doi:10.1186/1744-8069-3-33
85. Ji RR, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):135-148. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.011
86. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science (80-)*. 2002;298(5600):1911-1912. doi:10.1126/science.1072682
87. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. *Endocr Rev*. 2001;22(2):153-183. doi:10.1210/edrv.22.2.0428
88. Bading H, Greenberg ME. Stimulation of Protein Tyrosine Phosphorylation by NMDA Receptor Activation. *Science (80-)*. 1991;253(5022):912-914. doi:10.1126/science.1715095
89. Fiore RS, Murphy TH, Sanghera JS, Pelech SL, Baraban JM. Activation of p42 Mitogen-Activated Protein Kinase by Glutamate Receptor Stimulation in Rat Primary Cortical Cultures. *J Neurochem*. 1993;61(5):1626-1633. doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb09796.x
90. Rosen LB, Ginty DD, Weber MJ, Greenberg ME. Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron*. 1994;12(6):1207-1221. doi:10.1016/0896-6273(94)90438-3
91. Slusarczyk J, Trojan E, Glombik K, et al. Anti-inflammatory properties of tianeptine on lipopolysaccharide-induced changes in microglial cells involve Toll-like receptor-related pathways. *J Neurochem*. Published online 2015:n/a-n/a. doi:10.1111/jnc.13452
92. Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci*. 1999;2(12):1114-1119. doi:10.1038/16040
93. Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain*. 2005;114(1):149-159. doi:10.1016/j.pain.2004.12.022
94. Xu Z, Wang BR, Wang X, et al. ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase mediate iNOS-induced spinal neuron degeneration after acute traumatic spinal cord injury. *Life Sci*. 2006;79(20):1895-1905. doi:10.1016/j.lfs.2006.06.023
95. Han M, Huang RY, Du YM, Zhao ZQ, Zhang YQ. Early intervention of ERK activation in the spinal cord can block initiation of peripheral nerve injury-induced neuropathic pain in rats. *Sheng Li Xue Bao*. 2011;63(2):106-114.
96. Popiolek-Barczyk K, Kolosowska N, Piotrowska A, et al. Parthenolide Relieves Pain and Promotes M2 Microglia/Macrophage Polarization in Rat Model of Neuropathy. *Neural Plast*. 2015;2015:1-15. doi:10.1155/2015/676473
97. Popiolek-Barczyk K, Makuch W, Rojewska E, Pilat D, Mika J. Inhibition of intracellular signaling pathways NF-κB and MEK1/2 attenuates neuropathic pain development and enhances morphine analgesia. *Pharmacol Reports*. 2014;66(5):845-851. doi:10.1016/j.pharep.2014.05.001
98. Ciruela A, Dixon AK, Bramwell S, Gonzalez MI, Pinnock RD, Lee K. Identification of MEK1 as a novel target for the treatment of neuropathic pain. *Br J Pharmacol*. 2003;138(5):751-756. doi:10.1038/sj.bjp.0705103
99. Rojewska E, Popiolek-Barczyk K, Kolosowska N, et al. PD98059 Influences Immune Factors and Enhances Opioid Analgesia in Model of Neuropathy. Beggs S, ed. *PLoS One*. 2015;10(10):e0138583. doi:10.1371/journal.pone.0138583
100. Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji RR. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Activated after a Spinal Nerve Ligation in Spinal Cord Microglia and Dorsal Root Ganglion Neurons and Contributes to the Generation of Neuropathic Pain. *J Neurosci*. 2003;23(10):4017-4022. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-10-04017.2003
101. Zhou TT, Wu JR, Chen ZY, Liu ZX, Miao B. Effects of dexmedetomidine on P2X4Rs, p38-MAPK and BDNF in spinal microglia in rats with spared nerve injury. *Brain Res*. 2014;1568. doi:10.1016/j.brainres.2014.04.025
102. Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Inoue K. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia*. 2004;45(1):89-95. doi:10.1002/glia.10308

103. Zhou X, Cheng H, Xu D, et al. Attenuation of Neuropathic Pain by Saikosaponin a in a Rat Model of Chronic Constriction Injury. *Neurochem Res*. Published online 2014:2136-2142. doi:10.1007/s11064-014-1407-y
104. Wen YR, Suter MR, Kawasaki Y, et al. Nerve Conduction Blockade in the Sciatic Nerve Prevents but Does Not Reverse the Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Spinal Microglia in the Rat Spared Nerve Injury Model. *Anesthesiology*. 2007;107(2):312-321. doi:10.1097/01.anes.0000270759.11086.e7
105. Taves S, Berta T, Liu DL, et al. Spinal inhibition of p38 MAP kinase reduces inflammatory and neuropathic pain in male but not female mice: Sex-dependent microglial signaling in the spinal cord. *Brain Behav Immun*. 2016;55. doi:10.1016/j.bbi.2015.10.006
106. Rojewska E, Popiolek-Barczyk K, Jurga AM, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Involvement of pro- and antinociceptive factors in minocycline analgesia in rat neuropathic pain model. *J Neuroimmunol*. 2014;277(1-2):57-66. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.09.020
107. Chen L;, Wang H;, Xing J;, et al. Silencing P2X7R Alleviates Diabetic Neuropathic Pain Involving TRPV1 via PKCε/P38MAPK/NF-κB Signaling Pathway in Rats. *Int J Mol Sci 2022, Vol 23, Page 14141*. 2022;23(22):14141. doi:10.3390/IJMS232214141
108. Milligan ED, Twining C, Chacur M, et al. Spinal Glia and Proinflammatory Cytokines Mediate Mirror-Image Neuropathic Pain in Rats. *J Neurosci*. 2003;23(3):1026-1040. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-03-01026.2003
109. Sweitzer SM, Medicherla S, Almirez R, et al. Antinociceptive action of a p38α MAPK inhibitor, SD-282, in a diabetic neuropathy model. *Pain*. 2004;109(3):409-419. doi:10.1016/j.pain.2004.02.016
110. Gilhotra N, Sharma A, Singh M, Dhingra D. Involvement of p38 MAPkinase in attenuation of antinociceptive effect of morphine in diabetic mice. *Indian J Exp Biol*. 2007;45:654-656.
111. Wang Z, Chabot JG, Quirion R. On the possible role of ERK, p38 and CaMKII in the regulation of CGRP expression in morphine-tolerant rats. *Mol Pain*. 2011;7. doi:10.1186/1744-8069-7-68
112. Anand P, Shenoy R, Palmer JE, et al. Clinical trial of the p38 MAP kinase inhibitor dilmapimod in neuropathic pain following nerve injury. *Eur J Pain*. 2011;15(10). doi:10.1016/j.ejpain.2011.04.005
113. Ostenfeld T, Krishen A, Lai RY, et al. A randomized, placebo-controlled trial of the analgesic efficacy and safety of the p38 MAP kinase inhibitor, losmapimod, in patients with neuropathic pain from lumbosacral radiculopathy. *Clin J Pain*. 2015;31(4). doi:10.1097/AJP.0000000000000122
114. Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, et al. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J Neurosci*. 2006;26(13):3551-3560. doi:10.1523/JNEUROSCI.5290-05.2006
115. Ma W, Quirion R. Partial sciatic nerve ligation induces increase in the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in astrocytes in the lumbar spinal dorsal horn and the gracile nucleus. *Pain*. 2002;99(1-2). doi:10.1016/S0304-3959(02)00097-0
116. Mei XP, Zhang H, Wang W, et al. Inhibition of spinal astrocytic c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation correlates with the analgesic effects of ketamine in neuropathic pain. *J Neuroinflammation*. 2011;8(1):6. doi:10.1186/1742-2094-8-6
117. He N, Qu YJ, Li DY, Yue SW. RIP3 Inhibition ameliorates chronic constriction injury-induced neuropathic pain by suppressing JNK signaling. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(21). doi:10.18632/aging.203691
118. Marcus DJ, Zee M, Hughes A, et al. Tolerance to the Antinociceptive Effects of Chronic Morphine Requires C-Jun N-Terminal Kinase. *Mol Pain*. 2015;11(1):34-. doi:10.1186/s12990-015-0031-4
119. Jiang Z, Wu S, Wu X, Zhong J, Lv A, Jiao J CZ. Blocking mammalian target of rapamycin alleviates bone cancer pain and morphine tolerance via μ-opioid receptor. *Int J Cancer*. Published online 2015.
120. Jiang SP1, Zhang ZD2, Kang LM3, Wang QH1, Zhang L1 CH. Celecoxib reverts oxaliplatin-induced neuropathic pain through inhibiting PI3K/Akt2 pathway in the mouse dorsal root ganglion. *Exp Neurol*. Published online 2016.

121. Sun R, Yan J, Willis WD. Activation of protein kinase B/Akt in the periphery contributes to pain behavior induced by capsaicin in rats. *Neuroscience*. 2007;144:286-294. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.08.084
122. Xu JT, Tu HY, Xin WJ, Liu XG, Zhang GH, Zhai CH. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Exp Neurol*. 2007;206(2):269-279. doi:10.1016/j.expneurol.2007.05.029
123. Pezet S, Marchand F, D'Mello R, et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase Is a Key Mediator of Central Sensitization in Painful Inflammatory Conditions. *J Neurosci*. 2008;28(16):4261-4270. doi:10.1523/JNEUROSCI.5392-07.2008
124. Sun RQ, Tu YJ, Yan JY, Willis WD. Activation of protein kinase B/Akt signaling pathway contributes to mechanical hypersensitivity induced by capsaicin. *Pain*. 2006;120(1-2):86-96. doi:10.1016/j.pain.2005.10.017
125. Yu LN, Zhou XL, Yu J, et al. PI3K contributed to modulation of spinal nociceptive information related to ephrinBs/EphBs. *PLoS One*. 2012;7(8):e40930. doi:10.1371/journal.pone.0040930
126. Fang Y, Peng X, Bu H, Jia X, Gao F, Liu C. Chemokine CXCL10 regulates pain behaviors via PI3K-AKT signaling pathway in mice. *Neuropeptides*. 2022;93:102243. doi:10.1016/J.NPEP.2022.102243
127. You HP, Xu CJ, Zhang LH, et al. Taselisib moderates neuropathic pain through PI3K/AKT signaling pathway in a rat model of chronic constriction injury. *Brain Res Bull*. 2023;199:110671. doi:10.1016/j.brainresbull.2023.110671
128. Sutherland TC, Geoffroy CG. The Influence of Neuron-Extrinsic Factors and Aging on Injury Progression and Axonal Repair in the Central Nervous System. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8. doi:10.3389/fcell.2020.00190
129. Xie AX, Taves S, McCarthy K. Nuclear Factor κB-COX2 Pathway Activation in Non-myelinating Schwann Cells Is Necessary for the Maintenance of Neuropathic Pain in vivo. *Front Cell Neurosci*. 2022;15:782275. doi:10.3389/fncel.2021.782275
130. Pokhilko A, Nash A, Cader MZ. Common transcriptional signatures of neuropathic pain. *Pain*. 2020;161(7):1542-1554. doi:10.1097/j.pain.0000000000001847
131. Lee MK, Han SR, Park MK, et al. Behavioral Evidence for the Differential Regulation of p-p38 MAPK and p-NF-κB in Rats with Trigeminal Neuropathic Pain. *Mol Pain*. 2011;7:57. doi:10.1186/1744-8069-7-57
132. Zhou C, Shi X, Huang H, Zhu Y, Wu Y. Montelukast Attenuates Neuropathic Pain Through Inhibiting p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor-Kappa B in a Rat Model of Chronic Constriction Injury. *Anesth Analg*. 2014;118(5):1090-1096. doi:10.1213/ANE.0000000000000174
133. Ma W, Bisby M a. Increased activation of nuclear factor kappa B in rat lumbar dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injuries. *Brain Res*. 1998;797(2):243-254.
134. Meunier A, Latrémolière A, Dominguez E, et al. Lentiviral-mediated Targeted NF- κ B Blockade in Dorsal Spinal Cord Glia Attenuates Sciatic Nerve Injury – induced Neuropathic Pain in the Rat. 2007;15(4):687-697. doi:10.1038/mt.sj.6300107
135. Miyoshi K, Obata K, Kondo T, Okamura H, Noguchi K. Interleukin-18-Mediated Microglia/Astrocyte Interaction in the Spinal Cord Enhances Neuropathic Pain Processing after Nerve Injury. *J Neurosci*. 2008;28(48):12775-12787. doi:10.1523/JNEUROSCI.3512-08.2008
136. Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2018;1865(5):721-733. doi:10.1016/j.bbamcr.2018.02.010
137. Brandes MS, Gray NE. NRF2 as a Therapeutic Target in Neurodegenerative Diseases. *ASN Neuro*. 2020;12(1). doi:10.1177/1759091419899782
138. Ferreira-Chamorro P, Redondo A, Riego G, Leánez S, Pol O. Sulforaphane Inhibited the Nociceptive Responses, Anxiety- and Depressive-Like Behaviors Associated With Neuropathic Pain and Improved the Anti-allodynic Effects of Morphine in Mice. *Front Pharmacol*. 2018;9(NOV):1332. doi:10.3389/fphar.2018.01332
139. Li S, Yang C, Fang X, et al. Role of Keap1-Nrf2 Signaling in Anhedonia Symptoms in a Rat Model of Chronic Neuropathic Pain: Improvement With Sulforaphane. *Front Pharmacol*. 2018;9(AUG). doi:10.3389/FPHAR.2018.00887

140. Li J, Ma J, Lacagnina MJ, et al. Oral Dimethyl Fumarate Reduces Peripheral Neuropathic Pain in Rodents via NFE2L2 Antioxidant Signaling. *Anesthesiology*. 2020;132(2):343-356. doi:10.1097/ALN.0000000000003077
141. Ciapała K, Mika J. Advances in Neuropathic Pain Research: Selected Intracellular Factors as Potential Targets for Multidirectional Analgesics. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(11). doi:10.3390/PH16111624
142. Anekar AA, Hendrix JM, Cascella M. WHO Analgesic Ladder. *J R Coll Physicians Edinb*. 2023;38(3):284-285. doi:10.1177/14782715200838030211
143. Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, et al. Advances in Neuropathic Pain. *Arch Neurol*. 2003;60(11):1524. doi:10.1001/archneur.60.11.1524
144. Dobrogowski J, Wordliczek J, Woroń J. Farmakoterapia bólu. *Termedia*. Published online 2014.
145. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3:17002. doi:10.1038/nrdp.2017.2
146. Szczudlik A, Dobrogowski J, Wordliczek J, et al. Diagnosis and management of neuropathic pain: Review of literature and recommendations of the Polish Association for the Study of Pain and the Polish Neurological Society – Part Two. *Neurol Neurochir Pol*. 2014;48(6):423-435. doi:10.1016/j.pjnns.2014.11.002
147. Murnion BP. Neuropathic pain: current definition and review of drug treatment. *Aust Prescr*. 2018;41(3):60-63. doi:10.18773/austprescr.2018.022
148. Rosenberger DC, Blechschmidt V, Timmerman H, Wolff A, Treede RD. Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy. *J Neural Transm*. 2020;127(4):589-624. doi:10.1007/s00702-020-02145-7
149. Kaye AD, Armistead G, Amedio LS, et al. Evolving Treatment Strategies for Neuropathic Pain: A Narrative Review. *Medicina (B Aires)*. 2025;61(6):1063. doi:10.3390/medicina61061063
150. Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. *Pain*. 2007;132(3):237-251. doi:10.1016/j.pain.2007.08.033
151. Ahmadi R, Kuner R, Weidner N, Keßler J, Bendszus M, Krieg SM. The diagnosis and treatment of neuropathic pain. *Dtsch Arztebl Int*. 2024;121(25):825. doi:10.3238/arztebl.m2024.0215
152. Spallone V. Management of Painful Diabetic Neuropathy: Guideline Guidance or Jungle? *Curr Diab Rep*. 2012;12(4):403-413. doi:10.1007/s11892-012-0287-2
153. Wiffen PJ, Derry S, Bell RF, et al. Gabapentin for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;2020(2). doi:10.1002/14651858.CD007938.pub4
154. Szczudlik A, Dobrogowski J, Wordliczek J, et al. Diagnosis and management of neuropathic pain: Review of literature and recommendations of the Polish Association for the Study of Pain and the Polish Neurological Society – Part one. *Neurol Neurochir Pol*. 2014;48(4):262-271. doi:10.1016/j.pjnns.2014.07.011
155. Kalso E, Edwards JE, Moore AR, McQuay HJ. Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. *Pain*. 2004;112(3):372-380. doi:10.1016/j.pain.2004.09.019
156. Kwiatkowski K, Mika J. The importance of chemokines in neuropathic pain development and opioid analgesic potency. *Pharmacol Reports*. 2018;70(4):821-830. doi:10.1016/j.pharep.2018.01.006
157. Mercadante S, Arcuri E, Santoni A. Opioid-Induced Tolerance and Hyperalgesia. *CNS Drugs*. 2019;33(10):943-955. doi:10.1007/S40263-019-00660-0
158. Wilson SH, Hellman KM, James D, Adler AC, Chandrakantan A. Mechanisms, diagnosis, prevention and management of perioperative opioid-induced hyperalgesia. *Pain Manag*. 2021;11(4):405. doi:10.2217/PMT-2020-0105
159. Brook K, Bennett J, Desai SP. The Chemical History of Morphine: An 8000-year Journey, from Resin to de-novo Synthesis. *J Anesth Hist*. 2017;3(2):50-55. doi:10.1016/j.janh.2017.02.001
160. Blakemore PR, White JD. Morphine, the Proteus of organic molecules. *Chem Commun*. 2002;2(11):1159-1168. doi:10.1039/B111551K
161. Mytych W, Aebisher D, Bartusik-Aebisher D. Morphine. In: *The 100 Most Important Chemical Compounds*. Greenwood Publishing Group, Inc.; 2007:184-187. doi:10.5040/9798400605284.ch-060
162. Kalso E. How different is oxycodone from morphine? *Pain*. 2007;132(3):227-228. doi:10.1016/j.pain.2007.09.027

163. Nasseef MT, Singh JP, Ehrlich AT, et al. Oxycodone-Mediated Activation of the Mu Opioid Receptor Reduces Whole Brain Functional Connectivity in Mice. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2019;2(4):264-274. doi:doi: 10.1021/acsptsci.9b00021
164. Dębowska P, Przeklasa-Muszyńska A, Kocot-Kępska M. Buprenorphine as a unique opioid analgesic – an overview ofexperimental and clinical data. *BÓL*. 2024;25(3):16-31. doi:10.5604/01.3001.0054.7779
165. Gilron I, Max MB. Combination pharmacotherapy for neuropathic pain: current evidence and future directions. *Expert Rev Neurother*. 2005;5(6):823-830. doi:10.1586/14737175.5.6.823
166. Afonso AS, Carnaval T, Cés SV. Combination Therapy for Neuropathic Pain: A Review of Recent Evidence. *J Clin Med*. 2021;10(16). doi:10.3390/JCM10163533
167. Balanaser M, Carley M, Baron R, et al. Combination pharmacotherapy for the treatment of neuropathic pain in adults: systematic review and meta-analysis. *Pain*. 2023;164(2):230-251. doi:10.1097/J.PAIN.0000000000002688
168. Vorobeychik Y, Gordin V, Mao J, Chen L. Combination Therapy for Neuropathic Pain. *CNS Drugs*. 2011;25(12):1023-1034. doi:10.2165/11596280-000000000-00000
169. Dash SS, Khatri NK, Divyateja S, Bhate J, Rao GKS. Advances in neuropathic pain management: A review of real-world studies. *J Curr Res Sci Med*. Published online April 9, 2024. doi:10.4103/jcrsm.jcrsm_132_23
170. Ciapała K, Pawlik K, Ciechanowska A, Mika J, Rojewska E. Effect of pharmacological modulation of the kynurenine pathway on pain-related behavior and opioid analgesia in a mouse model of neuropathic pain. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2023;461:116382. doi:10.1016/j.taap.2023.116382
171. Ciapała K, Rojewska E, Pawlik K, Ciechanowska A, Mika J. Analgesic Effects of Fisetin, Peimine, Astaxanthin, Artemisinin, Bardoxolone Methyl and 740 Y-P and Their Influence on Opioid Analgesia in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Int J Mol Sci*. 2023;24(10):9000. doi:10.3390/ijms24109000
172. Ciapała K, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J. Astaxanthin has a beneficial influence on pain-related symptoms and opioid-induced hyperalgesia in mice with diabetic neuropathy-evidence from behavioral studies. *Pharmacol Rep*. 2024;76(6):1346-1362. doi:10.1007/S43440-024-00671-9
173. Ciapała K, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J. Promising effects of astaxanthin on pain-related behaviors and morphine tolerance in a mouse model of neuropathic pain: Possible involvement of Nrf2 and the NMDA receptor subunit NR2B. *Neurotherapeutics*. 2025;22(6):e00765. doi:10.1016/j.neurot.2025.e00765
174. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33(1):87-107. Accessed May 30, 2018. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2837713
175. Rojewska E, Wawrzczak-Bargiela A, Szucs E, et al. Alterations in the Activity of Spinal and Thalamic Opioid Systems in a Mice Neuropathic Pain Model. *Neuroscience*. 2018;390:293-302. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.08.013
176. Gabra BH, Sirois P. Beneficial effect of chronic treatment with the selective bradykinin B1 receptor antagonists, R-715 and R-954, in attenuating streptozotocin-diabetic thermal hyperalgesia in mice. *Peptides*. 2003;24(8):1131-1139. doi:10.1016/j.peptides.2003.06.003
177. McEvoy RC, Andersson J, Sandler S, Hellerstrom C. Multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in the mouse. Evidence for stimulation of a cytotoxic cellular immune response against an insulin-producing beta cell line. *J Clin Invest*. 1984;74(3):715. doi:10.1172/JCI111487
178. Burkart V, Wang ZQ, Radons J, et al. Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. *Nat Med 1999 53*. 1999;5(3):314-319. doi:10.1038/6535
179. Hylden JLK, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: A new technique. *Eur J Pharmacol*. 1980;67(2-3):313-316. doi:10.1016/0014-2999(80)90515-4
180. Turner P V., Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of substances to laboratory animals: Routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011;50(5):600-613. Accessed June 14, 2021. /pmc/articles/PMC3189662/
181. Diehl KH, Hull R, Morton D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol*. 2001;21(1):15-23. doi:10.1002/JAT.727

182. Shimizu S. Routes of Administration. In: *The Laboratory Mouse*. Elsevier; 2004:527-542. doi:10.1016/B978-012336425-8/50085-6
183. Bogacka J, Ciapała K, Pawlik K, Dobrogowski J, Przeklasa-Muszynska A, Mika J. Blockade of CCR4 Diminishes Hypersensitivity and Enhances Opioid Analgesia – Evidence from a Mouse Model of Diabetic Neuropathy. *Neuroscience*. 2020;441:77-92. doi:10.1016/j.neuroscience.2020.06.025
184. Rojewska E, Korostynski M, Przewlocki R, Przewlocka B, Mika J. Expression profiling of genes modulated by minocycline in a rat model of neuropathic pain. *Mol Pain*. 2014;10(1). doi:10.1186/1744-8069-10-47
185. Badawy AAB. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. *Int J Tryptophan Res*. 2017;10(1). doi:10.1177/1178646917691938
186. Mithaiwala MN, Santana-Coelho D, Porter GA, O'Connor JC. Neuroinflammation and the Kynurenine Pathway in CNS Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells*. 2021;10(6):1548. doi:10.3390/cells10061548
187. Guillemin GJ, Smith DG, Smythe GA, Armati PJ, Brew BJ. Expression of the kynurenine pathway enzymes in human microglia and macrophages. *Adv Exp Med Biol*. 2003;527:105-112. doi:10.1007/978-1-4615-0135-0_12
188. Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, et al. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: A paradox for neuronal protection. *J Neurochem*. 2001;78(4):842-853. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00498.x
189. Schembri E. Are Opioids Effective in Relieving Neuropathic Pain? *SN Compr Clin Med*. 2019;1(1):30-46. doi:10.1007/s42399-018-0009-4
190. Alles SRA, Smith PA. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. *Pharmacol Rev*. 2018;70(2):315-347. doi:10.1124/PR.117.014399
191. Mika J. Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. *Pharmacol Rep*. 2008;60(3):297-307. Accessed May 30, 2018. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18622054
192. Ma W, Quirion R. The ERK/MAPK pathway, as a target for the treatment of neuropathic pain. *Expert Opin Ther Targets*. 2005;9(4):699-713. doi:10.1517/14728222.9.4.699
193. Mika J, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Makuch W, Starowicz K, Przewlocka B. Delta-Opioid Receptor Analgesia Is Independent of Microglial Activation in a Rat Model of Neuropathic Pain. Taylor B, ed. *PLoS One*. 2014;9(8):e104420. doi:10.1371/journal.pone.0104420
194. Mika J, Rojewska E, Makuch W, Przewlocka B. Minocycline reduces the injury-induced expression of prodynorphin and pronociceptin in the dorsal root ganglion in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience*. 2010;165(4):1420-1428. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.11.064
195. Mika J, Osikowicz M, Rojewska E, et al. Differential activation of spinal microglial and astroglial cells in a mouse model of peripheral neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2009;623(1-3):65-72. doi:10.1016/j.ejphar.2009.09.030
196. Piao ZG, Cho IH, Park CK, et al. Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. *Pain*. 2006;121(3):219-231. doi:10.1016/J.PAIN.2005.12.023
197. Hua XY, Svensson CI, Matsui T, Fitzsimmons B, Yaksh TL, Webb M. Intrathecal minocycline attenuates peripheral inflammation-induced hyperalgesia by inhibiting p38 MAPK in spinal microglia. *Eur J Neurosci*. 2005;22(10):2431-2440. doi:10.1111/J.1460-9568.2005.04451.X
198. Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC, Yong VW. Targeting leukocyte MMPs and transmigration. *Brain*. 2002;125(6):1297-1308. doi:10.1093/brain/awf133
199. Zychowska M, Rojewska E, Kreiner G, Nalepa I, Przewlocka B, Mika J. Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. *J Neuroimmunol*. 2013;262(1-2):35-45. doi:10.1016/j.jneuroim.2013.06.005
200. Raghavendra V, Tanga F, Deleo JA. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306(2):624-630. doi:10.1124/JPET.103.052407
201. Zhao X, Wang C, Cui WG, Ma Q, Zhou WH. Fisetin exerts antihyperalgesic effect in a mouse model of neuropathic pain: Engagement of spinal serotonergic system. *Sci Rep*. 2015;5. doi:10.1038/srep09043

202. Xu J, Zhao W, Pan L, et al. Peimine, a main active ingredient of Fritillaria, exhibits anti-inflammatory and pain suppression properties at the cellular level. *Fitoterapia*. 2016;111:1-6. doi:10.1016/j.fitote.2016.03.018
203. Jiang X, Yan Q, Liu F, et al. Chronic trans-astaxanthin treatment exerts antihyperalgesic effect and corrects co-morbid depressive like behaviors in mice with chronic pain. *Neurosci Lett*. 2018;662:36-43. doi:10.1016/j.neulet.2017.09.064
204. Mahoney SA, Venkatasubramanian R, Darrah MA, et al. Intermittent supplementation with fisetin improves arterial function in old mice by decreasing cellular senescence. *Aging Cell*. 2024;23(3). doi:10.1111/acel.14060
205. Lockwood SF, O'Malley S, Mosher GL. Improved aqueous solubility of crystalline astaxanthin (3,3′-dihydroxy-β, β-carotene-4,4′-dione) by Captisol® (sulfobutyl ether β-cyclodextrin). *J Pharm Sci*. 2003;92(4). doi:10.1002/jps.10359
206. Zhou YQ, Mei W, Tian XB, Tian YK, Liu DQ, Ye DW. The therapeutic potential of Nrf2 inducers in chronic pain: Evidence from preclinical studies. *Pharmacol Ther*. 2021;225:107846. doi:10.1016/j.pharmthera.2021.107846
207. Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci*. 2001;24(8):450-455. doi:10.1016/S0166-2236(00)01854-3
208. McMahon SB, Cafferty WBJ, Marchand F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol*. 2005;192(2):444-462. doi:10.1016/j.expneurol.2004.11.001
209. Ji RR, Samad T a., Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*. 2002;36(1):57-68. doi:10.1016/S0896-6273(02)00908-X
210. Mika J, Osikowicz M, Makuch W, Przewlocka B. Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2007;560(2-3):142-149. doi:10.1016/j.ejphar.2007.01.013
211. Basu P, Averitt DL, Maier C, Basu A. The Effects of Nuclear Factor Erythroid 2 (NFE2)-Related Factor 2 (Nrf2) Activation in Preclinical Models of Peripheral Neuropathic Pain. *Antioxidants*. 2022;11(2):430. doi:10.3390/antiox11020430
212. Zhao L, Tao X, Song T. Astaxanthin alleviates neuropathic pain by inhibiting the MAPKs and NF-κB pathways. *Eur J Pharmacol*. 2021;912:174575. doi:10.1016/j.ejphar.2021.174575
213. Zhao L, Tao X, Wan C, et al. Astaxanthin alleviates inflammatory pain by regulating the p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-erythroid factor 2-related factor/heme oxygenase-1 pathways in mice. *Food Funct*. 2021;12(24):12381-12394. doi:10.1039/D1FO02326H
214. Pawlik K, Ciapała K, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J. Pharmacological modulation of neutrophils, in contrast to that of macrophages/microglia, is sex independent and delays the development of morphine tolerance in a mouse model of neuropathic pain. *Biomed Pharmacother*. 2025;187:118149. doi:10.1016/j.biopha.2025.118149
215. Sharma K, Sharma D, Sharma M, et al. Astaxanthin ameliorates behavioral and biochemical alterations in in-vitro and in-vivo model of neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 2018;674:162-170. doi:10.1016/j.neulet.2018.03.030
216. Wu LJ, Zhuo M. Targeting the NMDA receptor subunit NR2B for the treatment of neuropathic pain. *Neurotherapeutics*. 2009;6(4):693-702. doi:10.1016/J.NURT.2009.07.008
217. Niesters M, Martini C, Dahan A. Ketamine for chronic pain: risks and benefits. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;77(2):357-367. doi:10.1111/BCP.12094
218. Zhou B, et A. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10027):1513-1530. doi:10.1016/S0140-6736(16)00618-8
219. Feldman EL, Nave KA, Jensen TS, Bennett DLH. New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron*. 2017;93(6):1296-1313. doi:10.1016/j.neuron.2017.02.005
220. Dodson M, Shakya A, Anandhan A, Chen J, Garcia JGN, Zhang DD. NRF2 and Diabetes: The Good, the Bad, and the Complex. *Diabetes*. 2022;71(12). doi:10.2337/db22-0623
221. Bai HP, Liu P, Wu YM, Guo WY, Guo YX, Wang XL. Activation of spinal GABAB receptors normalizes N-methyl-D-aspartate receptor in diabetic neuropathy. *J Neurol Sci*. 2014;341(1-2). doi:10.1016/j.jns.2014.04.002

222. Ruddick JP, Evans AK, Nutt DJ, Lightman SL, Rook GAW, Lowry CA. Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev Mol Med*. 2006;8(20):1-27. doi:10.1017/S1462399406000068
223. Correia AS, Vale N. Tryptophan Metabolism in Depression: A Narrative Review with a Focus on Serotonin and Kynurenine Pathways. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15). doi:10.3390/IJMS23158493
224. Giuliano MG, Tognini P. Tryptophan Metabolism in Neurodevelopment and Its Implications For Neurodevelopmental Disorders. *Mol Neurobiol*. 2025;63(1). doi:10.1007/S12035-025-05437-9
225. Gao K, Mu C long, Farzi A, Zhu W yun. Tryptophan Metabolism: A Link Between the Gut Microbiota and Brain. *Adv Nutr*. 2020;11(3):709-723. doi:10.1093/advances/nmz127
226. Badawy AAB, Morgan CJ. Tryptophan metabolites as potent inhibitors of aldehyde dehydrogenase activity and potential alcoholism-aversion therapeutic agents. *Int Congr Ser*. 2007;1304:344-351. doi:10.1016/J.ICS.2007.07.020
227. Stone TW. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev*. 1993;45(3).
228. Krupa A, Kowalska I. The Kynurenine Pathway—New Linkage between Innate and Adaptive Immunity in Autoimmune Endocrinopathies. *Int J Mol Sci 2021, Vol 22, Page 9879*. 2021;22(18):9879. doi:10.3390/IJMS22189879
229. Baumgartner R, Forteza MJ, Ketelhuth DFJ. The interplay between cytokines and the Kynurenine pathway in inflammation and atherosclerosis. *Cytokine*. 2019;122:154148. doi:10.1016/J.CYTO.2017.09.004
230. Austin PJ, Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol*. 2010;229(1-2):26-50. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.08.013
231. Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishioka S. Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(1):55-61. doi:10.1016/j.coph.2011.10.007
232. Moon YW, Hajjar J, Hwu P, Naing A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother Cancer*. 2015;3(1). doi:10.1186/S40425-015-0094-9
233. Yao Y, Liang H, Fang X, et al. What is the prospect of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibition in cancer? Extrapolation from the past. *J Exp Clin Cancer Res 2021 401*. 2021;40(1):60-. doi:10.1186/S13046-021-01847-4
234. Jung KH, LoRusso P, Burris H, et al. Phase I Study of the Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor Navoximod (GDC-0919) Administered with PD-L1 Inhibitor (Atezolizumab) in Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019;25(11):3220-3228. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-2740
235. Zakharia Y, McWilliams RR, Rixe O, et al. Phase II trial of the IDO pathway inhibitor indoximod plus pembrolizumab for the treatment of patients with advanced melanoma. *J Immunother cancer*. 2021;9(6). doi:10.1136/JITC-2020-002057
236. Moyer BJ, Rojas IY, Murray IA, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors activate the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017;323:74-80. doi:10.1016/j.taap.2017.03.012
237. Pravettoni A, Colciago A, Negri-Cesi P, Villa S, Celotti F. Ontogenetic development, sexual differentiation, and effects of Aroclor 1254 exposure on expression of the arylhydrocarbon receptor and of the arylhydrocarbon receptor nuclear translocator in the rat hypothalamus. *Reprod Toxicol*. 2005;20(4):521-530. doi:10.1016/j.reprotox.2005.03.008
238. Stevens EA, Mezrich JD, Bradfield CA. The aryl hydrocarbon receptor: A perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*. 2009;127(3):299-311. doi:10.1111/J.1365-2567.2009.03054.X
239. Bahman F, Choudhry K, Al-Rashed F, Al-Mulla F, Sindhu S, Ahmad R. Aryl hydrocarbon receptor: current perspectives on key signaling partners and immunoregulatory role in inflammatory diseases. *Front Immunol*. 2024;15:1421346. doi:10.3389/fimmu.2024.1421346
240. Sheu ML, Pan LY, Sheehan J, Yang MY, Pan HC. Modulation of Aryl Hydrocarbon Receptor Expression Alleviated Neuropathic Pain in a Chronic Constriction Nerve Injury Animal Model. *Int J Mol Sci 2022, Vol 23, Page 11255*. 2022;23(19):11255. doi:10.3390/IJMS231911255
241. Matheus LHG, Dalmazzo SV, Brito RBO, et al. 1-Methyl-D-tryptophan activates aryl hydrocarbon receptor, a pathway associated with bladder cancer progression. *BMC Cancer*. 2020;20(1):869. doi:10.1186/s12885-020-07371-6

242. Lewis HC, Chinnadurai R, Bosinger SE, Galipeau J. The IDO inhibitor 1-methyl tryptophan activates the aryl hydrocarbon receptor response in mesenchymal stromal cells. *Oncotarget*. 2017;8(54):91914-91927. doi:10.18632/ONCOTARGET.20166
243. Heyliger SO, Goodman CB, Ngong JM, Soliman KFA. The analgesic effects of tryptophan and its metabolites in the rat. *Pharmacol Res*. 1998;38(4):243-250. doi:10.1006/phrs.1998.0362
244. Cosi C, Mannaioni G, Cozzi A, et al. G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: Studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. *Neuropharmacology*. 2011;60(7-8):1227-1231. doi:10.1016/J.NEUROPHARM.2010.11.014
245. Pineda-Farias JB, Pérez-Severiano F, González-Esquivel DF, et al. The l -kynurenine-probenecid combination reduces neuropathic pain in rats. *Eur J Pain*. 2013;17(9):1365-1373. doi:10.1002/j.1532-2149.2013.00305.x
246. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2011;478(7368):197-203. doi:10.1038/nature10491
247. Yamamoto T, Hatabayashi K, Arita M, et al. Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor maintains the undifferentiated state of human embryonic stem cells. *Sci Signal*. 2019;12(587). doi:10.1126/scisignal.aaw3306
248. Kaiser H, Parker E, Hamrick MW. Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor: Implications for aging and healthspan. *Exp Gerontol*. 2020;130:110797. doi:10.1016/j.exger.2019.110797
249. Kim HK, Park SK, Zhou JL, et al. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain*. 2004;111(1-2):116-124. doi:10.1016/J.PAIN.2004.06.008
250. Gao X, Kim HK, Chung JM, Chung K. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain*. 2007;131(3):262-271. doi:10.1016/J.PAIN.2007.01.011
251. Curto M, Lionetto L, Negro A, et al. Altered kynurenine pathway metabolites in serum of chronic migraine patients. *J Headache Pain*. 2016;17(1):47. doi:10.1186/s10194-016-0638-5
252. DiNatale BC, Murray IA, Schroeder JC, et al. Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling. *Toxicol Sci*. 2010;115(1):89-97. doi:10.1093/toxsci/kfq024
253. Wang J, Simonavicius N, Wu X, et al. Kynurenic Acid as a Ligand for Orphan G Protein-coupled Receptor GPR35. *J Biol Chem*. 2006;281(31):22021-22028. doi:10.1074/jbc.M603503200
254. Sun T, Xie R, He H, et al. Kynurenic acid ameliorates NLRP3 inflammasome activation by blocking calcium mobilization via GPR35. *Front Immunol*. 2022;13. doi:10.3389/FIMMU.2022.1019365
255. Gover TD, Moreira TH, Weinreich D. Role of Calcium in Regulating Primary Sensory Neuronal Excitability. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol 194. Springer, Berlin, Heidelberg; 2009:563-587. doi:10.1007/978-3-540-79090-7_16
256. Moroni F, Carpenedo R, Cozzi A, Meli E, Chiarugi A, Pellegrini-Giampietro DE. Studies on the neuroprotective action of kynurenine mono-oxygenase inhibitors in post-ischemic brain damage. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 527. Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003:127-136. doi:10.1007/978-1-4615-0135-0_15
257. Zwilling D, Huang SY, Sathyasaikumar K V., et al. Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. *Cell*. 2011;145(6):863-874. doi:10.1016/j.cell.2011.05.020
258. Cozzi A, Carpenedo R, Moroni F. Kynurenine hydroxylase inhibitors reduce ischemic brain damage: Studies with (m-nitrobenzoyl)-alanine (mNBA) and 3,4-dimethoxy-[-N-4-(nitrophenyl)thiazol-2YL]-benzenesulfonamide (Ro 61-8048) in models of focal or global brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(7):771-777. doi:10.1097/00004647-199907000-00007
259. Crunkhorn S. Restoring the balance. *Nat Rev Drug Discov 2011 108*. 2011;10(8):576-576. doi:10.1038/nrd3521
260. Stone TW, Perkins MN. Quinolinic acid: A potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol*. 1981;72(4):411-412. doi:10.1016/0014-2999(81)90587-2
261. Lugo-Huitrón R, Ugalde Muñiz P, Pineda B, Pedraza-Chaverrí J, Ríos C, Pérez-De La Cruz V. Quinolinic acid: An endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxid Med Cell Longev*. Published online 2013. doi:10.1155/2013/104024
262. Przewlocki R, Przewlocka B. Opioids in neuropathic pain. *Curr Pharm Des*. 2005;11(23):3013-3025. doi:10.2174/1381612054865055

263. Nakamura A, Hasegawa M, Minami K, et al. Differential activation of the μ-opioid receptor by oxycodone and morphine in pain-related brain regions in a bone cancer pain model. *Br J Pharmacol*. 2013;168(2):375-388. doi:10.1111/J.1476-5381.2012.02139.X
264. Drewes AM, Jensen RD, Nielsen LM, et al. Differences between opioids: pharmacological, experimental, clinical and economical perspectives. *Br J Clin Pharmacol*. 2012;75(1):60. doi:10.1111/J.1365-2125.2012.04317.X
265. Zador F, Samavati R, Szlavicz E, et al. Inhibition of opioid receptor mediated G-protein activity after chronic administration of kynurenic acid and its derivative without direct binding to opioid receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13(9):1520-1529. doi:10.2174/1871527314666141205164114
266. Ferrini F, Trang T, Mattioli TAM, et al. Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl− homeostasis. *Nat Neurosci*. 2013;16(2):183-192. doi:10.1038/nn.3295
267. Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Jurga AM, et al. Minocycline Enhances the Effectiveness of Nociceptin/Orphanin FQ during Neuropathic Pain. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/762930
268. Sathyasaikumar K V., de la Cruz VP, Pineda B, et al. Cellular Localization of Kynurenine 3-Monooxygenase in the Brain: Challenging the Dogma. *Antioxidants 2022, Vol 11, Page 315*. 2022;11(2):315. doi:10.3390/ANTIOX11020315
269. Maganin AG, Souza GR, Fonseca MD, et al. Meningeal dendritic cells drive neuropathic pain through elevation of the kynurenine metabolic pathway in mice. *J Clin Invest*. 2022;132(23). doi:10.1172/JCI153805
270. Pais ML, Martins J, Castelo-Branco M, Gonçalves J. Sex Differences in Tryptophan Metabolism: A Systematic Review Focused on Neuropsychiatric Disorders. *Int J Mol Sci 2023, Vol 24, Page 6010*. 2023;24(6):6010. doi:10.3390/IJMS24066010
271. Jellen LC, Escobar Galvis ML, Sha Q, et al. Sex differences in peripheral and central dysregulation of the kynurenine pathway in Parkinson's disease. *npj Park Dis 2025 111*. 2025;11(1):116-. doi:10.1038/s41531-025-00949-6
272. Turska-Kozłowska M, Pedraz-Petrozzi B, Paluszkiewicz P, Parada-Turska J. Different Kynurenine Pathway Dysregulation in Systemic Sclerosis in Men and Women. *Int J Mol Sci 2024, Vol 25, Page 3842*. 2024;25(7):3842. doi:10.3390/IJMS25073842
273. Dylla L, Higgins HM, Poisson SN, et al. Sex Differences in Tryptophan Metabolism via the Kynurenine Pathway in Acute Ischemic Stroke. *Clin Ther*. 2024;46(12):960-966. doi:10.1016/J.CLINTHERA.2024.10.015
274. Varga N, Csapó E, Majláth Z, et al. Targeting of the kynurenic acid across the blood–brain barrier by core-shell nanoparticles. *Eur J Pharm Sci*. 2016;86:67-74. doi:10.1016/J.EJPS.2016.02.012
275. Majláth Z, Tajti J, Vécsei L. Kynurenines and other novel therapeutic strategies in the treatment of dementia. *Ther Adv Neurol Disord*. 2013;6(6):386-397. doi:10.1177/1756285613494989
276. Szűcs E, Stefanucci A, Dimmito MP, et al. Discovery of Kynurenines Containing Oligopeptides as Potent Opioid Receptor Agonists. *Biomolecules*. 2020;10(2):284. doi:10.3390/biom10020284
277. Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain*. 2005;115(1-2):71-83. doi:10.1016/j.pain.2005.02.009
278. Morgado C, Pereira-Terra P, Cruz CD, Tavares I. Minocycline completely reverses mechanical hyperalgesia in diabetic rats through microglia-induced changes in the expression of the potassium chloride co-transporter 2 (KCC2) at the spinal cord. *Diabetes, Obes Metab*. 2011;13(2):150-159. doi:10.1111/j.1463-1326.2010.01333.x
279. Singh S, Khanna D, Kalra S. Minocycline and Doxycycline: More Than Antibiotics. *Curr Mol Pharmacol*. 2021;14(6):1046-1065. doi:10.2174/1874467214666210210122628
280. Niimi N, Kohyama K, Matsumoto Y. Minocycline suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing tissue inhibitors of metalloproteinases. *Neuropathology*. 2013;33(6):612-620. doi:10.1111/neup.12039
281. Piotrowska A, Kwiatkowski K, Rojewska E, et al. Direct and indirect pharmacological modulation of CCL2/CCR2 pathway results in attenuation of neuropathic pain — In vivo and in vitro evidence. *J Neuroimmunol*. 2016;297:9-19. doi:10.1016/j.jneuroim.2016.04.017
282. Zhou YQ, Liu DQ, Chen SP, et al. Minocycline as a promising therapeutic strategy for chronic pain. *Pharmacol Res*. 2018;134:305-310. doi:10.1016/j.phrs.2018.07.002

283. Cui XY, Dai Y, Wang SL, et al. Differential activation of p38 and extracellular signal-regulated kinase in spinal cord in a model of bee venom-induced inflammation and hyperalgesia. *Mol Pain*. 2008;4. doi:10.1186/1744-8069-4-17
284. Crown ED, Gwak YS, Ye Z, Johnson KM, Hulsebosch CE. Activation of p38 MAP kinase is involved in central neuropathic pain following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2008;213(2). doi:10.1016/j.expneurol.2008.05.025
285. Milligan ED, O'Connor KA, Armstrong CB, et al. Systemic administration of CNI-1493, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, blocks intrathecal human immunodeficiency virus-1 gp120-induced enhanced pain states in rats. *J Pain*. 2001;2(6). doi:10.1054/jpai.2001.26174
286. Cheng KI, Wang HC, Chuang YT, et al. Persistent mechanical allodynia positively correlates with an increase in activated microglia and increased P-p38 mitogen-activated protein kinase activation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pain (United Kingdom)*. 2014;18(2). doi:10.1002/j.1532-2149.2013.00356.x
287. Li Z, Ding X, Wu H, Liu C. Artemisinin inhibits angiogenesis by regulating p38 MAPK/CREB/TSP-1 signaling pathway in osteosarcoma. *J Cell Biochem*. 2019;120(7). doi:10.1002/jcb.28424
288. Wang KS, Li J, Wang Z, et al. Artemisinin inhibits inflammatory response via regulating NF-κB and MAPK signaling pathways. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2017;39(1). doi:10.1080/08923973.2016.1267744
289. Ying M, Liu H, Zhang T, et al. Effect of artemisinin on neuropathic pain mediated by P2X4 receptor in dorsal root ganglia. *Neurochem Int*. 2017;108. doi:10.1016/j.neuint.2017.02.004
290. Dehkordi FM, Kaboutari J, Zendehdel M, Javdani M. The antinociceptive effect of artemisinin on the inflammatory pain and role of GABAergic and opioidergic systems. *Korean J Pain*. 2019;32(3). doi:10.3344/kjp.2019.32.3.160
291. Elisei LMS, Moraes TR, Malta IH, et al. Antinociception induced by artemisinin nanocapsule in a model of postoperative pain via spinal TLR4 inhibition. *Inflammopharmacology*. 2020;28(6). doi:10.1007/s10787-020-00756-w
292. Aderibigbe B. Design of Drug Delivery Systems Containing Artemisinin and Its Derivatives. *Molecules*. 2017;22(2):323. doi:10.3390/molecules22020323
293. Schmuck G, Roehrdanz E, Haynes RK, Kahl R. Neurotoxic Mode of Action of Artemisinin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(3):821. doi:10.1128/AAC.46.3.821-827.2002
294. Zhao X, Huang X, Yang C, Jiang Y, Zhou W, Zheng W. Artemisinin Attenuates Amyloid-Induced Brain Inflammation and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF-κB Signaling. *Int J Mol Sci*. 2022;23(11). doi:10.3390/ijms23116354
295. Zhang W, Wang F, Zhang L, Sun T, Fu Z. Intrathecal injection of ozone alleviates CCI-induced neuropathic pain via the GluR6-NF-κB/p65 signalling pathway in rats. *Mol Med Rep*. 2021;23(4):231. doi:10.3892/mmr.2021.11870
296. Xu L, Liu Y, Sun Y, Li H, Mi W, Jiang Y. Analgesic effects of TLR4/NF-κB signaling pathway inhibition on chronic neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Biomed Pharmacother*. 2018;107:526-533. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.116
297. Miao J, Zhou X, Ji T, Chen G. NF-κB p65-dependent transcriptional regulation of histone deacetylase 2 contributes to the chronic constriction injury-induced neuropathic pain via the microRNA-183/TXNIP/NLRP3 axis. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1). doi:10.1186/s12974-020-01901-6
298. Lei J, Yang J, Cheng S, et al. Peimine induces apoptosis of glioblastoma cells through regulation of the PI3K/AKT signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2024;28(6). doi:10.3892/ETM.2024.12737
299. Pradhan SM, Mandal P, Mathew AA, et al. Unveiling the therapeutic potential of plant steroid peimine: A study on apoptotic induction in MRMT-1 cell line-induced breast cancer in rats. *Steroids*. 2024;209:109467. doi:10.1016/j.steroids.2024.109467
300. Liu C, Sun J, Shen X, et al. Peimine promotes microglial polarization to the M2 phenotype to attenuate drug-resistant epilepsy through suppressing the TLR4/NF-κB/HIF-1α signaling pathway in a rat model and in BV-2 microglia. *Heliyon*. 2024;10(15). doi:10.1016/J.HELIYON.2024.E34987
301. Ren Q, Guo F, Tao S, Huang R, Ma L, Fu P. Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF-κB p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice. *Biomed Pharmacother*. 2020;122:109772. doi:10.1016/j.biopha.2019.109772

302. Zhao X, Li XL, Liu X, et al. Antinociceptive effects of fisetin against diabetic neuropathic pain in mice: Engagement of antioxidant mechanisms and spinal GABAA receptors. *Pharmacol Res*. 2015;102:286-297. doi:10.1016/j.phrs.2015.10.007
303. Sánchez-Alegría K, Flores-León M, Avila-Muñoz E, Rodríguez-Corona N, Arias C. PI3K Signaling in Neurons: A Central Node for the Control of Multiple Functions. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):3725. doi:10.3390/IJMS19123725
304. Liu W, Lv Y, Ren F. PI3K/Akt Pathway is Required for Spinal Central Sensitization in Neuropathic Pain. *Cell Mol Neurobiol*. 2018;38(3):747-755. doi:10.1007/s10571-017-0541-x
305. Sundarraj K, Raghunath A, Panneerselvam L, Perumal E. Fisetin Inhibits Autophagy in HepG2 Cells via PI3K/Akt/mTOR and AMPK Pathway. *Nutr Cancer*. 2021;73(11-12). doi:10.1080/01635581.2020.1836241
306. Pal HC, Athar M, Elmets CA, Afaq F. Fisetin inhibits UVB-induced cutaneous inflammation and activation of PI3K/AKT/NFκB signaling pathways in SKH-1 hairless mice. *Photochem Photobiol*. 2015;91(1):225-234. doi:10.1111/php.12337
307. Lim JY, Lee JY, Byun BJ, Kim SH. Fisetin targets phosphatidylinositol-3-kinase and induces apoptosis of human B lymphoma Raji cells. *Toxicol Reports*. 2015;2:984-989. doi:10.1016/j.toxrep.2015.07.004
308. Saponaro C, Cianciulli A, Calvello R, Dragone T, Iacobazzi F, Panaro MA. The PI3K/Akt pathway is required for LPS activation of microglial cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2012;34(5):858-865. doi:10.3109/08923973.2012.665461
309. Park HY, Kim ND, Kim GY, et al. Inhibitory effects of diallyl disulfide on the production of inflammatory mediators and cytokines in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;262(2):177-184. doi:10.1016/j.taap.2012.04.034
310. Tarassishin L, Suh HS, Lee SC. Interferon regulatory factor 3 plays an anti-inflammatory role in microglia by activating the PI3K/Akt pathway. *J Neuroinflammation*. 2011;8(1):187. doi:10.1186/1742-2094-8-187
311. Jana M, Jana A, Liu X, Ghosh S, Pahan K. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated up-regulation of I kappa B alpha in anti-inflammatory effect of gemfibrozil in microglia. *J Immunol*. 2007;179(6):4142-4152. doi:10.4049/JIMMUNOL.179.6.4142
312. Li X, Yang S, Wang L, et al. Resveratrol inhibits paclitaxel-induced neuropathic pain by the activation of pi3k/akt and sirti/pgcia pathway. *J Pain Res*. 2019;12:879-890. doi:10.2147/JPR.S185873
313. Telrandhe UB, Telange DR, Mishra V, Aljabali AAA, Mishra Y. Unveiling the therapeutic potential of Fisetin: Bridging traditional knowledge with modern medicine. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2025;112:107232. doi:10.1016/J.JDDST.2025.107232
314. Khan N, Syed DN, Ahmad N, Mukhtar H. Fisetin: A Dietary Antioxidant for Health Promotion. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(2):151. doi:10.1089/ARS.2012.4901
315. Nishida Y, Berg PC, Shakersain B, et al. Astaxanthin: Past, Present, and Future. *Mar Drugs*. 2023;21(10):514. doi:10.3390/MD21100514/S1
316. Zhu X, Chen X, Wang M, Hu H. Astaxanthin: A Compound in the Prevention of Chronic Diseases and as a Potential Adjuvant Treatment Agent. *Antioxidants*. 2025;14(6):715. doi:10.3390/antiox14060715
317. Turck D, Castenmiller J, de Henauw S, et al. Safety of astaxanthin for its use as a novel food in food supplements. *EFSA J*. 2020;18(2). doi:10.2903/j.efsa.2020.5993
318. Si P, Zhu C. Biological and neurological activities of astaxanthin (Review). *Mol Med Rep*. 2022;26(4). doi:10.3892/mmr.2022.12816
319. Wu Q, Zhang XS, Wang HD, et al. Astaxanthin activates nuclear factor erythroid-related factor 2 and the antioxidant responsive element (nrf2-are) pathway in the brain after subarachnoid hemorrhage in rats and attenuates early brain injury. *Mar Drugs*. 2014;12(12):6125-6141. doi:10.3390/md12126125
320. Feng F, Qiu H. Neuroprotective effect of tanshinone IIA against neuropathic pain in diabetic rats through the Nrf2/ARE and NF-κB signaling pathways. *Kaohsiung J Med Sci*. 2018;34(8):428-437. doi:10.1016/j.kjms.2018.03.005
321. Sun J, Li JY, Zhang LQ, et al. Nrf2 Activation Attenuates Chronic Constriction Injury-Induced Neuropathic Pain via Induction of PGC-1 α -Mediated Mitochondrial Biogenesis in the Spinal Cord. Braun R, ed. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021(1). doi:10.1155/2021/9577874

322. Zhou Y qun, Liu D qiang, Chen S ping, et al. Nrf2 activation ameliorates mechanical allodynia in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Acta Pharmacol Sin*. 2020;41(8):1041-1048. doi:10.1038/s41401-020-0394-6
323. Kalvala AK, Kumar R, Sherkhane B, Gundu C, Arruri VK, Kumar A. Bardoxolone Methyl Ameliorates Hyperglycemia Induced Mitochondrial Dysfunction by Activating the keap1-Nrf2-ARE Pathway in Experimental Diabetic Neuropathy. *Mol Neurobiol*. 2020;57(8):3616-3631. doi:10.1007/s12035-020-01989-0
324. Wen YR, Tan PH, Cheng JK, Liu YC, Ji RR. Microglia: A Promising Target for Treating Neuropathic and Postoperative Pain, and Morphine Tolerance. *J Formos Med Assoc*. 2011;110(8):487-494. doi:10.1016/S0929-6646(11)60074-0
325. Hervera A, Leánez S, Pol O. The inhibition of the nitric oxide-cGMP-PKG-JNK signaling pathway avoids the development of tolerance to the local antiallodynic effects produced by morphine during neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2012;685(1-3):42-51. doi:10.1016/J.EJPHAR.2012.04.009
326. Okerman T, Jurgenson T, Moore M, Klein AH. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase-AKT-cyclic GMP-c-Jun N-terminal kinase signaling pathway attenuates the development of morphine tolerance in a mouse model of neuropathic pain. *Mol Pain*. 2021;17. doi:10.1177/17448069211003375
327. Khan MI, Momeny M, Ostadhadi S, et al. Thalidomide attenuates development of morphine dependence in mice by inhibiting PI3K/Akt and nitric oxide signaling pathways. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2018;82:39-48. doi:10.1016/J.PNPBP.2017.12.002
328. Galasso C, Orefice I, Pellone P, et al. On the Neuroprotective Role of Astaxanthin: New Perspectives? *Mar Drugs*. 2018;16(8):247. doi:10.3390/MD16080247
329. Gao F, Wu X, Mao X, et al. Astaxanthin provides neuroprotection in an experimental model of traumatic brain injury via the Nrf2/HO-1 pathway. *Am J Transl Res*. 2021;13(3):1483.
330. Bahbah EI, Ghozy S, Attia MS, et al. Molecular Mechanisms of Astaxanthin as a Potential Neurotherapeutic Agent. *Mar Drugs*. 2021;19(4):201. doi:10.3390/MD19040201
331. Fakhri S, Dargahi L, Abbaszadeh F, Jorjani M. Astaxanthin attenuates neuroinflammation contributed to the neuropathic pain and motor dysfunction following compression spinal cord injury. *Brain Res Bull*. 2018;143:217-224. doi:10.1016/j.brainresbull.2018.09.011
332. Zhou X yan, Zhang F, Hu X tong, et al. Depression can be prevented by astaxanthin through inhibition of hippocampal inflammation in diabetic mice. *Brain Res*. 2017;1657:262-268. doi:10.1016/j.brainres.2016.12.018
333. Mika J, Zychowska M, Makuch W, Rojewska E, Przewlocka B. Neuronal and immunological basis of action of antidepressants in chronic pain - clinical and experimental studies. *Pharmacol Rep*. 2013;65(6):1611-1621. doi:10.1016/S1734-1140(13)71522-6
334. Birkinshaw H, Friedrich CM, Cole P, et al. Antidepressants for pain management in adults with chronic pain: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2023;2023(5). doi:10.1002/14651858.CD014682.pub2
335. Wen X, Xiao L, Zhong Z, et al. Astaxanthin acts via LRP-1 to inhibit inflammation and reverse lipopolysaccharide-induced M1/M2 polarization of microglial cells. *Oncotarget*. 2017;8(41):69370-69385. doi:10.18632/oncotarget.20628
336. Zhou X, Zhang J, Li Y, Cui L, Wu K, Luo H. Astaxanthin inhibits microglia M1 activation against inflammatory injury triggered by lipopolysaccharide through down-regulating miR-31-5p. *Life Sci*. 2021;267:118943. doi:10.1016/j.lfs.2020.118943
337. Babalola JA, Lang M, George M, et al. Astaxanthin enhances autophagy, amyloid beta clearance and exerts anti-inflammatory effects in in vitro models of Alzheimer's disease-related blood brain barrier dysfunction and inflammation. *Brain Res*. 2023;1819:148518. doi:10.1016/j.brainres.2023.148518
338. Li Y, Wang Q, Chu C, Liu S. Astaxanthin protects retinal ganglion cells from acute glaucoma via the Nrf2/HO-1 pathway. *J Chem Neuroanat*. 2020;110. doi:10.1016/j.jchemneu.2020.101876
339. Heidari Khoei H, Fakhri S, Parvardeh S, Shams Mofarahe Z, Baninameh Z, Vardiani M. Astaxanthin prevents the methotrexate-induced reproductive toxicity by targeting oxidative stress in male mice. *Toxin Rev*. 2019;38(3). doi:10.1080/15569543.2018.1452263
340. Eslami M, Esfandyari S, Aghahosseini M, et al. Astaxanthin protects human granulosa cells against oxidative stress through activation of NRF2/ARE pathway and its downstream phase II enzymes. *Cell J*. 2021;23(3). doi:10.22074/cellj.2021.7222

341. Wang L, He C. Nrf2-mediated anti-inflammatory polarization of macrophages as therapeutic targets for osteoarthritis. *Front Immunol*. 2022;13:967193. doi:10.3389/fimmu.2022.967193
342. Li XY, Fang ZM, Guo SJ, et al. NMDA Receptors in Neuropathic Pain: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Neuroscientist*. Published online 2026. doi:10.1177/10738584251410528
343. Braidy N, Grant R, Brew BJ, Adams S, Jayasena T, Guillemin GJ. Effects of kynurenine pathway metabolites on intracellular NAD+ synthesis and cell death in human primary astrocytes and neurons. *Int J Tryptophan Res*. 2009;2(1):61-69. doi:10.4137/ijtr.s2318
344. Gunn J, Hill MM, Cotton BM, Deer TR. An analysis of biomarkers in patients with chronic pain. *Pain Physician*. 2020;23(1):E41-E49. doi:10.36076/ppj.2020/23/e41
345. Chizh BA, Headley PM, Tzschentke TM. NMDA receptor antagonists as analgesics: Focus on the NR2B subtype. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(12):636-642. doi:10.1016/S0165-6147(00)01863-0
346. Kim Y, Cho HY, Ahn YJ, Kim J, Yoon YW. Effect of NMDA NR2B antagonist on neuropathic pain in two spinal cord injury models. *Pain*. 2012;153(5):1022-1029. doi:10.1016/J.PAIN.2012.02.003
347. Mihara Y, Egashira N, Sada H, et al. Involvement of spinal NR2B-containing NMDA receptors in oxaliplatin-induced mechanical allodynia in rats. *Mol Pain*. 2011;7:8. doi:10.1186/1744-8069-7-8
348. Kreutzwiser D, Tawfic QA. Expanding Role of NMDA Receptor Antagonists in the Management of Pain. *CNS Drugs*. 2019;33(4):347-374. doi:10.1007/S40263-019-00618-2
349. Thompson T, Whiter F, Gallop K, et al. NMDA receptor antagonists and pain relief: A meta-analysis of experimental trials. *Neurology*. 2019;92(14):E1652-E1662. doi:10.1212/WNL.0000000000007238
350. Kamp J, Van Velzen M, Olofsen E, Boon M, Dahan A, Niesters M. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for NMDA-receptor antagonist ketamine in the treatment of chronic neuropathic pain: an update of the most recent literature. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019;15(12):1033-1041. doi:10.1080/17425255.2019.1689958
351. Bell RF, Kalso EA. Ketamine for pain management. *Pain Reports*. 2018;3(5). doi:10.1097/PR9.0000000000000674
352. Guimarães Pereira JE, Pereira LFG, Linhares RM, Bersot CDA, Aslanidis T, Ashmawi HA. Efficacy and Safety of Ketamine in the Treatment of Neuropathic Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Pain Res*. 2022;15:1011. doi:10.2147/JPR.S358070
353. Ko SW, Wu LJ, Shum F, Quan J, Zhuo M. Cingulate NMDA NR2B receptors contribute to morphine-induced analgesic tolerance. *Mol Brain*. 2008;1(1):2. doi:10.1186/1756-6606-1-2
354. Mao J. Opioid-induced abnormal pain sensitivity: Implications in clinical opioid therapy. *Pain*. 2002;100(3):213-217. doi:10.1016/S0304-3959(02)00422-0
355. Mao J, Price DD, Mayer DJ. Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. *J Neurosci*. 1994;14(4):2301-2312. doi:10.1523/JNEUROSCI.14-04-02301.1994
356. Kadanangode Narayanaswam N, Caston E, Satish Kumar RC, et al. A randomized interventional clinical trial assessing the safety and effectiveness of PeaNoc XL tablets in managing joint pain and inflammation in arthritis patients. *F1000Research*. 2023;12:895. doi:10.12688/f1000research.138477.1
357. Park MH, Jung JC, Hill S, et al. FlexPro MD®, a Combination of Krill Oil, Astaxanthin and Hyaluronic Acid, Reduces Pain Behavior and Inhibits Inflammatory Response in Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis in Rats. *Nutrients*. 2020;12(4):956. doi:10.3390/nu12040956

9. SPIS WSZYTSKICH PUBLIKACJI

Prace przeglądowe:

1. **Ciapała K**, Rojewska E: Kinureniny w ośrodkowym układzie nerwowym a ból neuropatyczny - kliniczne implikacje badań podstawowych. Ból 2019; 20(3): 32-39. https://doi.org/10.5604/01.3001.0013.7396.
   $MNiSW_{2019}$=40

2. **Ciapała K**, Mika J, Rojewska E. The Kynurenine Pathway as a Potential Target for Neuropathic Pain Therapy Design: From Basic Research to Clinical Perspectives. Int J Mol Sci. 2021 Oct 13;22(20):11055. doi: 10.3390/ijms222011055.
   IF_{2021}= 6.208; $MNiSW_{2021}$=140

3. **Ciapała K**, Mika J. Advances in Neuropathic Pain Research: Selected Intracellular Factors as Potential Targets for Multidirectional Analgesics. Pharmaceuticals (Basel). 2023 Nov 17;16(11):1624. doi: 10.3390/ph16111624.
   IF_{2023}=4.3; $MNiSW_{2023}$=140

4. Bogacka J, Pawlik K, **Ciapała K**, Ciechanowska A, Mika J. CC Chemokine Receptor 4 (CCR4) as a Possible New Target for Therapy. Int J Mol Sci. 2022 Dec 9;23(24):15638. doi: 10.3390/ijms232415638.
   IF_{2022}= 5.600; $MNiSW_{2022}$=100

Prace oryginalne:

5. Rojewska E, **Ciapała K**, Piotrowska A, Makuch W, Mika J. Pharmacological Inhibition of Indoleamine 2,3-Dioxygenase-2 and Kynurenine 3-Monooxygenase, Enzymes of the Kynurenine Pathway, Significantly Diminishes Neuropathic Pain in a Rat Model. Front Pharmacol. 2018 Jul 11;9:724. doi:10.3389/fphar.2018.00724.
   IF_{2018}= 3.845; $MNiSW_{2018}$=40

6. Rojewska E, **Ciapała K**, Mika J. Kynurenic acid and zaprinast diminished CXCL17-evoked pain-related behaviour and enhanced morphine analgesia in a mouse neuropathic pain model. Pharmacol Rep. 2019 Feb;71(1):139-148. doi:10.1016/j.pharep.2018.10.002. Epub 2018 Oct 6.
   IF_{2019}= 2.754; $MNiSW_{2019}$=70

7. Kwiatkowski K, Popiolek-Barczyk K, Piotrowska A, Rojewska E, **Ciapała K**, Makuch W, Mika J Chemokines CCL2 and CCL7, but not CCL12, play a significantrole in the development of pain-related behavior and opioid-induced analgesia. Cytokine. 2019 Jul;119:202-213. doi: 10.1016/j.cyto.2019.03.007. Epub 2019 Apr 16.
   IF_{2019}=2.952; $MNiSW_{2019}$=100

8. Pawlik K, Piotrowska A, Kwiatkowski K, **Ciapała K**, Popiolek-Barczyk K, Makuch W, Mika J. The blockade of CC chemokine receptor type 1 influences the level of nociceptive factors and enhances opioid analgesic potency in a rat model of neuropathic pain. Immunology. 2020 Apr;159(4):413-428. doi: 10.1111/imm.13172. Epub 2020 Feb 5.
   IF_{2020}= 7.397; $MNiSW_{2020}$=100

9. Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Pawlik K, **Ciapała K**, Oggioni M, Mercurio D, De Simoni MG, Mika J. Changes in macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) family members expression induced by traumatic brain injury in mice. Immunobiology. 2020 May;225(3):151911. doi: 10.1016/j.imbio.2020.151911. Epub 2020 Feb 1.
IF_{2020}= 3.144; $MNiSW_{2021}$=100

10. Kwiatkowski K, **Ciapała K**, Rojewska E, Makuch W, Mika J. Comparison of the beneficial effects of RS504393, maraviroc and cenicriviroc on neuropathic pain- related symptoms in rodents: behavioral and biochemical analyses. Int Immunopharmacol. 2020 Jul;84:106540. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106540. Epub 2020 May 11.
IF_{2020}= 4.932; $MNiSW_{2020}$=70

11. Bogacka J, **Ciapała K**, Pawlik K, Kwiatkowski K, Dobrogowski J, Przeklasa-Muszynska A, Mika J. CCR4 Antagonist (C021) Administration Diminishes Hypersensitivity and Enhances the Analgesic Potency of Morphine and Buprenorphine in a Mouse Model of Neuropathic Pain. Front Immunol. 2020 Jul 14;11:1241. doi: 10.3389/fimmu.2020.01241. **IF_{2020}= 7.561; $MNiSW_{2020}$=140**

12. Bogacka J, **Ciapała K**, Pawlik K, Dobrogowski J, Przeklasa-Muszynska A, Mika J. Blockade of CCR4 Diminishes Hypersensitivity and Enhances Opioid Analgesia - Evidence from a Mouse Model of Diabetic Neuropathy. Neuroscience. 2020 Aug 10;441:77-92. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.06.025. Epub 2020 Jun 24.
IF_{2020}= 3.590; $MNiSW_{2020}$=140

13. Popiolek-Barczyk K, Ciechanowska A, **Ciapała K**, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D, de Simoni MG, Mika J. The CCL2/CCL7/CCL12/CCR2 pathway is substantially and persistently upregulated in mice after traumatic brain injury, and CCL2 modulates the complement system in microglia. Mol Cell Probes. 2020 Dec;54:101671. doi: 10.1016/j.mcp.2020.101671. Epub 2020 Nov 4.
IF_{2020}= 2.365; $MNiSW_{2020}$=70

14. Ciechanowska A, Popiolek-Barczyk K, Ciapała K, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D, de Simoni MG, Mika J. Traumatic brain injury in mice induces changes in the expression of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes. Pharmacol Rep. 2020 Dec;72(6):1579-1592. doi: 10.1007/s43440-020-00187-y. Epub 2020 Nov 13.
IF_{2020}= 3.027; $MNiSW_{2020}$=100

15. Kwiatkowski K, Pawlik K, **Ciapała K**, Piotrowska A, Makuch W, Mika J. Bidirectional Action of Cenicriviroc, a CCR2/CCR5 Antagonist, Results in Alleviation of Pain-Related Behaviors and Potentiation of Opioid Analgesia in Rats With Peripheral Neuropathy. Front Immunol. 2020 Dec 21;11:615327. doi: 10.3389/fimmu.2020.615327.
IF_{2020}= 7.561; $MNiSW_{2020}$=140

16. Ciechanowska A, **Ciapała K**, Pawlik K, Oggioni M, Mercurio D, De Simoni MG, Mika J. Initiators of Classical and Lectin Complement Pathways Are Differently Engaged after Traumatic Brain Injury-Time-Dependent Changes in the Cortex, Striatum, Thalamus and Hippocampus in a Mouse Model. Int J Mol Sci. 2020 Dec 22;22(1):45. doi: 10.3390/ijms22010045.
IF_{2020}= 5.924; $MNiSW_{2020}$=140

17. Piotrowska A, **Ciapała K**, Pawlik K, Kwiatkowski K, Rojewska E, Mika J. Comparison of the Effects of Chemokine Receptors CXCR2 and CXCR3 Pharmacological Modulation in Neuropathic Pain Model - *In Vivo* and *In Vitro* Study. Int J Mol Sci. 2021 Oct 14;22(20):11074. doi: 10.3390/ijms222011074.
IF_{2021}= 6.208; $MNiSW_{2020}$=140

18. Pawlik K, Ciechanowska A, **Ciapała K**, Rojewska E, Makuch W, Mika J. Blockade of CC Chemokine Receptor Type 3 Diminishes Pain and Enhances Opioid Analgesic Potency in a Model of Neuropathic Pain. Front Immunol. 2021 Nov 2;12:781310. doi: 10.3389/fimmu.2021.781310.
IF_{2021}= 8.787; $MNiSW_{2021}$=140

19. Zajączkowska R, Rojewska E, Ciechanowska A, Pawlik K, **Ciapała K**, Kocot-Kępska M, Makuch W, Wordliczek J, Mika J. Mirogabalin Decreases Pain-like Behaviours and Improves Opioid and Ketamine Antinociception in a Mouse Model of Neuropathic Pain. Pharmaceuticals (Basel). 2022 Jan 13;15(1):88. doi:10.3390/ph15010088.
IF_{2022}= 4.600; $MNiSW_{2022}$=100

20. Ciechanowska A, Rojewska E, Piotrowska A, Barut J, Pawlik K, **Ciapała K**, Kreiner G, Mika J. New insights into the analgesic properties of the XCL1/XCR1 and XCL1/ITGA9 axes modulation under neuropathic pain conditions - evidence from animal studies. Front Immunol. 2022 Dec 22;13:1058204. doi:10.3389/fimmu.2022.1058204.
IF_{2022}= 7.300; $MNiSW_{2022}$=140

21. Pawlik K, **Ciapała K**, Ciechanowska A, Kwiatkowski K, Mika J. Pharmacological Evidence of the Important Roles of CCR1 and CCR3 and Their Endogenous Ligands CCL2/7/8 in Hypersensitivity Based on a Murine Model of Neuropathic Pain. Cells. 2022 Dec 26;12(1):98. doi: 10.3390/cells12010098.
IF_{2022}= 6.000; $MNiSW_{2022}$=140

22. Mazur G, Pańczyk-Straszak K, Rapacz A, Kiszela J, Smolik M, Gawlik M, Walczak M, Czekajewska J, Poloczek C, Karczewska E, Żesławska E, Nitek W, Niedbał A, Leśniak J, **Ciapała K**, Pawlik K, Mika J, Waszkielewicz AM. Promising anticonvulsant and/or analgesic compounds among 5-chloro-2- or 5-chloro-4-methyl derivatives of xanthone coupled to aminoalkanol moieties-Design, synthesis and pharmacological evaluation. Chem Biol Drug Des. 2023 Feb;101(2):278-325. doi:10.1111/cbdd.14102. Epub 2022 Dec 16.
IF_{2022}= 3.0; $MNiSW_{2022}$=70

23. Ciechanowska A, Pawlik K, **Ciapała K**, Mika J. Pharmacological Modulation of the MIP-1 Family and Their Receptors Reduces Neuropathic Pain Symptoms and Influences Morphine Analgesia: Evidence from a Mouse Model. Brain Sci. 2023 Mar 29;13(4):579. doi: 10.3390/brainsci13040579.
IF_{2023}= 3.300; $MNiSW_{2020}$=100

24. **Ciapała K**, Pawlik K, Ciechanowska A, Mika J, Rojewska E. Effect of pharmacological modulation of the kynurenine pathway on pain-related behavior and opioid analgesia in a mouse model of neuropathic pain. Toxicol Appl Pharmacol. 2023 Feb 15;461:116382. doi: 10.1016/j.taap.2023.116382.
IF_{2023}=3.3; $MNiSW_{2023}$=140

25. **Ciapała K**, Rojewska E, Pawlik K, Ciechanowska A, Mika J. Analgesic Effects of Fisetin, Peimine, Astaxanthin, Artemisinin, Bardoxolone Methyl and 740 Y-P and Their Influence on Opioid Analgesia in a Mouse Model of Neuropathic Pain. Int J Mol Sci. 2023 May 19;24(10):9000. doi: 10.3390/ijms24109000.
IF_{2023}= 4.9; $MNiSW_{2023}$=140

26. Kocot-Kępska M, Pawlik K, **Ciapała K**, Makuch W, Zajączkowska R, Dobrogowski J, Przeklasa-Muszyńska A, Mika J. Phenytoin Decreases Pain-like Behaviors and Improves Opioid Analgesia in a Rat Model of Neuropathic Pain. Brain Sci. 2023 May 25;13(6):858. doi: 10.3390/brainsci13060858.
IF_{2023}= 2.7; $MNiSW_{2020}$=100

27. Zajączkowska R, Pawlik K, **Ciapała K**, Piotrowska A, Ciechanowska A, Rojewska E, Kocot-Kępska M, Makuch W, Wordliczek J, Mika J. Mirogabalin Decreases Pain-like Behaviors by Inhibiting the Microglial/Macrophage Activation, p38MAPK Signaling, and Pronociceptive CCL2 and CCL5 Release in a Mouse Model of Neuropathic Pain. Pharmaceuticals (Basel). 2023 Jul 19;16(7):1023. doi: 10.3390/ph16071023.
IF_{2023}= 4.600; $MNiSW_{2023}$=140

28. Bober A, Piotrowska A, Pawlik K, **Ciapała K**, Maciuszek M, Makuch W, Mika J. A New Application for Cenicriviroc, a Dual CCR2/CCR5 Antagonist, in the Treatment of Painful Diabetic Neuropathy in a Mouse Model. Int J Mol Sci. 2024 Jul 5;25(13):7410. doi: 10.3390/ijms25137410.
IF_{2024}= 4.9; $MNiSW_{2024}$=140

29. **Ciapała K**, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J. Astaxanthin has a beneficial influence on pain-related symptoms and opioid-induced hyperalgesia in mice with diabetic neuropathy-evidence from behavioral studies. Pharmacol Rep. 2024 Dec;76(6):1346-1362. doi: 10.1007/s43440-024-00671-9.
IF_{2024}=3.8; $MNiSW_{2024}$=100

30. Pawlik K, **Ciapała K**, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J. Pharmacological modulation of neutrophils, in contrast to that of macrophages/microglia, is sex independent and delays the development of morphine tolerance in a mouse model of neuropathic pain. Biomed Pharmacother. 2025 Jun;187:118149. doi: 10.1016/j.biopha.2025.118149.
IF_{2024}= 7.5; $MNiSW_{2024}$=100

31. **Ciapała K**, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J. Promising effects of astaxanthin on pain-related behaviors and morphine tolerance in a mouse model of neuropathic pain: Possible involvement of Nrf2 and the NMDA receptor subunit NR2B. Neurotherapeutics. 2025 Oct;22(6):e00765. doi: 10.1016/j.neurot.2025.e00765.
IF_{2024}= 6.9; $MNiSW_{2024}$=140

32. Piotrowska A, Starnowska-Sokół J, **Ciapała K**, Barut J, Ciechanowska A, Kwiatkowski K, Rojewska E, Pawlik K, Kreiner G, Mika J. CCR2/CCR5 antagonism with cenicriviroc relieves neuropathic pain induced by sciatic nerve injury and delays morphine tolerance in mice. Biochem Pharmacol. 2026 Feb 6;247:117773. doi: 10.1016/j.bcp.2026.117773.
IF_{2024}= 5.6; $MNiSW_{2024}$=100

Sumaryczny IF = 154.555

Sumaryczna liczba punktów MNiSW = 3560

Łączna całkowita liczba cytowań = 646, bez autocytowań = 515

wg bazy Scopus – 3.03.2026

10. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW

Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Kraków 10.02.2026 r.

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że udział mgr Katarzyny Ciapały w wymienionych publikacjach opierał się na stworzeniu generalnej koncepcji badań, wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Żadna z poniższych publikacji nie stanowi i nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział polegał na współuczestnictwie w wykonywaniu części doświadczalnej.

1. "*Analgesic Effects of Fisetin, Peimine, Astaxanthin, Artemisinin, Bardoxolone Methyl and 740 Y-P and Their Influence on Opioid Analgesia in a Mouse Model of Neuropathic Pain*" Ciapała K, Rojewska E, **Pawlik K**, Ciechanowska A, Mika J. International Journal of Molecular Sciences, 2023; https://doi.org/10.3390/ijms24109000

2. "*Effect of pharmacological modulation of the kynurenine pathway on pain-related behavior and opioid analgesia in a mouse model of neuropathic pain*" Ciapała K, **Pawlik K**, Ciechanowska A, Mika J, Rojewska E. Toxicology and Applied Pharmacology, 2023; https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116382

3. "*Promising effects of astaxanthin on pain-related behaviors and morphine tolerance in a mouse model of neuropathic pain: Possible involvement of Nrf2 and the NMDA receptor subunit NR2B*". Ciapała K, **Pawlik K**, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J Neurotherapeutics 2025; doi: 10.1016/j.neurot.2025.e00765.

4. "*Astaxanthin has a beneficial influence on pain-related symptoms and opioid-induced hyperalgesia in mice with diabetic neuropathy-evidence from behavioral studies*". Ciapała K, **Pawlik K**, Ciechanowska A, Makuch W, Mika J. Pharmacological Reports. 2024; doi:10.1007/s43440-024-00671-9.

K. Pawlik - Szczerba

mgr inż. Katarzyna Pawlik-Szczerba

ul. Smętna 12
31-343 Kraków

e-mail: ifpan@if-pan.krakow.pl
www.if-pan.krakow.pl

tel.: +48 12 662 32 20
+48 12 662 32 05
+48 12 662 32 49
fax: +48 12 637 45 00

Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Kraków 10.02.2026 r.

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że udział mgr Katarzyny Ciapały w wymienionych publikacjach opierał się na stworzeniu generalnej koncepcji badań, wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Żadna z poniższych publikacji nie stanowi i nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział polegał na współuczestnictwie w wykonywaniu części doświadczalnej.

1. "*Analgesic Effects of Fisetin, Peimine, Astaxanthin, Artemisinin, Bardoxolone Methyl and 740 Y-P and Their Influence on Opioid Analgesia in a Mouse Model of Neuropathic Pain*" Ciapała K, Rojewska E, Pawlik K, **Ciechanowska A**, Mika J. International Journal of Molecular Sciences, 2023; https://doi.org/10.3390/ijms24109000

2. "*Effect of pharmacological modulation of the kynurenine pathway on pain-related behavior and opioid analgesia in a mouse model of neuropathic pain*" Ciapała K, Pawlik K, **Ciechanowska A**, Mika J, Rojewska E. Toxicology and Applied Pharmacology, 2023; https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116382

3. "*Promising effects of astaxanthin on pain-related behaviors and morphine tolerance in a mouse model of neuropathic pain: Possible involvement of Nrf2 and the NMDA receptor subunit NR2B*". Ciapała K, Pawlik K, **Ciechanowska A**, Makuch W, Mika J Neurotherapeutics 2025; doi: 10.1016/j.neurot.2025.e00765.

4. "*Astaxanthin has a beneficial influence on pain-related symptoms and opioid-induced hyperalgesia in mice with diabetic neuropathy-evidence from behavioral studies*". Ciapała K, Pawlik K, **Ciechanowska A**, Makuch W, Mika J. Pharmacological Reports. 2024; doi:10.1007/s43440-024-00671-9.

Agata Ciechanowska

dr Agata Ciechanowska

ul. Smętna 12
31-343 Kraków

e-mail: ifpan@if-pan.krakow.pl
www.if-pan.krakow.pl

tel.: +48 12 662 32 20
+48 12 662 32 05
+48 12 662 32 49
fax: +48 12 637 45 00

Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Kraków 10.02.2026 r.

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że udział mgr Katarzyny Ciapały w wymienionych publikacjach opierał się na stworzeniu generalnej koncepcji badań, wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Żadna z poniższych publikacji nie stanowi i nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział polegał na współuczestnictwie w wykonywaniu części doświadczalnej.

1. "*Promising effects of astaxanthin on pain-related behaviors and morphine tolerance in a mouse model of neuropathic pain: Possible involvement of Nrf2 and the NMDA receptor subunit NR2B*". Ciapała K, Pawlik K, Ciechanowska A, **Makuch W**, Mika J Neurotherapeutics 2025; doi: 10.1016/j.neurot.2025.e00765.

2. "*Astaxanthin has a beneficial influence on pain-related symptoms and opioid-induced hyperalgesia in mice with diabetic neuropathy-evidence from behavioral studies*". Ciapała K, Pawlik K, Ciechanowska A, **Makuch W**, Mika J. Pharmacological Reports. 2024; doi:10.1007/s43440-024-00671-9.

Wioletta Makuch

mgr Wioletta Makuch

ul. Smętna 12
31-343 Kraków

e-mail: ifpan@if-pan.krakow.pl
www.if-pan.krakow.pl

tel.: +48 12 662 32 20
+48 12 662 32 05
+48 12 662 32 49
fax: +48 12 637 45 00

Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Kraków 23.05.2024 r.

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że udział mgr Katarzyny Ciapały w wymienionych publikacjach opierał się na stworzeniu wraz ze mną generalnej koncepcji badań, wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Żadna z poniższych publikacji nie stanowi i nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział polegał również na finansowaniu badań z realizowanego przeze mnie projektu z Narodowego Centrum Nauki SONATA 2015/17/D/NZ4/02284.

1. "*The Kynurenine Pathway as a Potential Target for Neuropathic Pain Therapy Design: From Basic Research to Clinical Perspectives*" Ciapała K, Mika J, **Rojewska E.** International Journal of Molecular Sciences, 2021; https://doi.org/10.3390/ijms222011055

2. "*Analgesic Effects of Fisetin, Peimine, Astaxanthin, Artemisinin, Bardoxolone Methyl and 740 Y-P and Their Influence on Opioid Analgesia in a Mouse Model of Neuropathic Pain*" Ciapała K, **Rojewska E**, Pawlik K, Ciechanowska A, Mika J. International Journal of Molecular Sciences, 2023; https://doi.org/10.3390/ijms24109000

3. "*Effect of pharmacological modulation of the kynurenine pathway on pain-related behavior and opioid analgesia in a mouse model of neuropathic pain*" Ciapała K, Pawlik K, Ciechanowska A, Mika J, **Rojewska E**. Toxicology and Applied Pharmacology, 2023; https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116382

dr hab. Ewelina Rojewska-Mendel

ul. Smętna 12
31-343 Kraków

e-mail: ifpan@if-pan.krakow.pl
www.if-pan.krakow.pl

tel.: +48 12 662 32 20
+48 12 662 32 05
+48 12 662 32 49
fax: +48 12 637 45 00

Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Kraków 10.02.2026 r.

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że udział mgr Katarzyny Ciapały w wymienionych publikacjach opierał się na stworzeniu wraz ze mną generalnej koncepcji badań, wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Żadna z poniższych publikacji nie stanowi i nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział polegał również na finansowaniu badań z uzyskanego przeze mnie projektu z Narodowego Centrum Nauki OPUS 22 2021/43/B/NZ7/00230 oraz działalności statutowej Zakładu Farmakologii Bólu IF PAN.

1. "*The Kynurenine Pathway as a Potential Target for Neuropathic Pain Therapy Design: From Basic Research to Clinical Perspectives*" Ciapała K, **Mika J**, Rojewska E. International Journal of Molecular Sciences, 2021; https://doi.org/10.3390/ijms222011055

2. "*Advances in Neuropathic Pain Research: Selected Intracellular Factors as Potential Targets for Multidirectional Analgesics*". Ciapała K, **Mika J** Pharmaceuticals (Basel). 2023 doi: 10.3390/ph16111624

3. "*Analgesic Effects of Fisetin, Peimine, Astaxanthin, Artemisinin, Bardoxolone Methyl and 740 Y-P and Their Influence on Opioid Analgesia in a Mouse Model of Neuropathic Pain*" Ciapała K, Rojewska E, Pawlik K, Ciechanowska A, **Mika J**. International Journal of Molecular Sciences, 2023; https://doi.org/10.3390/ijms24109000

4. "*Effect of pharmacological modulation of the kynurenine pathway on pain-related behavior and opioid analgesia in a mouse model of neuropathic pain*" Ciapała K, Pawlik K, Ciechanowska A, **Mika J**, Rojewska E. Toxicology and Applied Pharmacology, 2023; https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116382

5. "*Promising effects of astaxanthin on pain-related behaviors and morphine tolerance in a mouse model of neuropathic pain: Possible involvement of Nrf2 and the NMDA receptor subunit NR2B*". Ciapała K, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, **Mika J** Neurotherapeutics 2025; doi: 10.1016/j.neurot.2025.e00765.

6. "*Astaxanthin has a beneficial influence on pain-related symptoms and opioid-induced hyperalgesia in mice with diabetic neuropathy-evidence from behavioral studies*". Ciapała K, Pawlik K, Ciechanowska A, Makuch W, **Mika J**. Pharmacological Reports. 2024; doi:10.1007/s43440-024-00671-9.

Joanna Mika

prof. dr hab. Joanna Mika

ul. Smętna 12
31-343 Kraków

e-mail: ifpan@if-pan.krakow.pl
www.if-pan.krakow.pl

tel.: +48 12 662 32 20
+48 12 662 32 05
+48 12 662 32 49
fax: +48 12 637 45 00

11. ZGODY II LOKALNEJ KOMISJI ETYCZNEJ

UCHWAŁA **NR 333/2017**

z dnia 07-12-2017

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

§ 1

Na podstawie art. 48 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266) po rozpatrzeniu wniosku pt. „Rola szlaku kinureninowego w bólu neuropatycznym w kontekście innowacyjnego podejścia terapeutycznego - kontynuacja projektu" z dnia 20-11-2017, złożonego przez: Instytut Farmakologii PAN, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków[1], zaplanowanego przez: dr Ewelinę Rojewska[2], lokalna komisja etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ[3]

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków[4]: 390 szczury rasy Wistar, ok. 62-67-dniowe; 120 myszy rasy Albino Swiss, ok. 32-38-dniowe; 9 szczurów rasy Wistar, ok. 2-miesięczne.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: dr Ewelina Rojewska, prof. dr hab. Joanna Mika, mgr Wioletta Makuch, mgr Klaudia Kwiatkowski, mgr Anna Piotrowska-Murzyn, Agnieszka Młynarczyk, mgr Joanna Kujacz, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, mgr inż. Katarzyna Pawlik.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie[5]: 01.01.2018 r. do 01.06.2019 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku[6]: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie[7] poddane ocenie retrospektywnej w terminie: do 6 miesięcy po zakończeniu realizacji badań.

---

[1] Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby;

[2] Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

[3] Niewłaściwy zapis usunąć

[4] Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju

[5] Nie dłużej niż 5 lat

[6] Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

[7] Niewłaściwy zapis usunąć

§ 3

Uzasadnienie:

Celem projektu będzie zbadanie wpływu uszkodzenia inicjującego ból neuropatyczny (luźne podwiązanie nerwu kulszowego) na zmiany w aktywności enzymów i produktów szlaku kinureninowego. W projekcie przedstawiono hipotezę udziału szlaku kinureniniwego w bólu neuropatycznym. Wiodącym założeniem tej hipotezy jest uznanie, że zahamowanie aktywności enzymów ścieżki neurotoksycznej szlaku może mieć właściwości neuroprotekcyjne i być jednym ze sposobów ochrony neuronów przed uszkodzeniami. W związku z powyższym, farmakologiczna modulacja szlaku kynureninowego może przynieść w przyszłości dobre efekty terapeutyczne, a zaplanowane badania powinny wskazać nowe cele terapeutyczne dla leków stosowanych w terapii bólu neuropatycznego.

W projekcie zaplanowano oznaczenie aktywności przeciwbólowej leków opioidowych u zwierząt, którym podane zostaną związki z grupy agonistów lub antagonistów szlaku kinureninowego. W planowanych eksperymentach Autorka zamierza wykorzystać minimalną konieczną liczbę zwierząt potrzebną do późniejszej oceny statystycznej. Po zakończonej procedurze zwierzęta zostaną uśmiercone przez dekapitację w celu pobrania tkanek do dalszej analizy. Część wniosku dotyczy badań na hodowlach pierwotnych. Do ich założenia posłużą 1—dniowe oseski szczurze pochodzące od ciężarnych samic. Samice zostaną uśmiercone metodami standardowymi (morbital, inhalacja CO2) po kilku miotach, w momencie gdy spada ich zdolność rozrodcza. Uśmiercenie samic jest uważane jako zootechniczne brakowanie z hodowli.

Organizacja badań uwzględnia zasady 3R. Oszacowanie liczebności grup i zwierząt w grupie jest prawidłowe (n=10/grupę). Liczebność grup została dobrana na podstawie dotychczasowych doświadczeń Autorki. Zwierzęta będą miały zapewnione odpowiednie warunki bytowania a doświadczenia będą przeprowadzone przez wykwalifikowany i doświadczony w proponowanej tematyce personel. Planowane badania mogą przeprowadzone tylko in vivo, gdyż badania dotyczące czucia bólu wymagają żywego organizmu. Alternatywne metody (np. hodowle tkankowe) nie mają w tym przypadku zastosowania. Procedury wykorzystywane w planowanym doświadczeniu są ogólnie stosowanymi i uznanymi testami in vivo. Dotkliwość procedur oszacowano poprawnie jako dotkliwą. Procedury obejmują: luźne podwiązanie nerwu kulszowego oraz testy behawioralne: test odsuwania ogona, von Frey'a, zimnej płytki, odsuwania łapy. Zaplanowane badania są istotne z naukowego oraz klinicznego punktu widzenia.

Podsumowując, w świetle przedstawionych we wniosku danych oraz biorąc pod uwagę znaczenie oczekiwanych wyników, zgoda komisji na wnioskowane badania jest uzasadniona. Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

II Lokalna Komisja Etyczna
do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie przy
Instytucie Farmakologii PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodniczący II Lokalnej Komisji
Etycznej do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie
dr. Adam Roman
Podpis przewodniczącego komisji
.....

Otrzymuje Użytkownik

Pouczenie:

Od decyzji komisji można wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej w terminie 14 od dnia otrzymania uchwały.

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

UCHWAŁA **NR 267/2020**

z dnia 08-10-2020

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą" po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie przeciwbólowego działania L-kinureniny w mysim modelu bólu neuropatycznego" z dnia 30-09-2020 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków[1], zaplanowanego przez: dr Ewelinę Rojewską[2], przy udziale[3]: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ[4]

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków[5]: mysz domowa, stado CD1 IGS, 240 szt., 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: dr Ewelina Rojewska, prof. dr hab. Joanna Mika, mgr Wioletta Makuch, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, Agnieszka Młynarczyk, mgr inż. Katarzyna Pawlik, mgr Joanna Bogacka.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie[6]: 01.11.2020 r. do 31.10.2024 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku[7]: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

§ 3

Uzasadnienie:

Zgodnie z art. 107 § 4 KPA, wobec uwzględnienia w całości wniosku strony, II Lokalna Komisja Etyczna odstępuje od uzasadnienia decyzji. Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.

---

[1] Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

[2] Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

[3] Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

[4] Niewłaściwy zapis usunąć.

[5] Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

[6] Nie dłużej niż 5 lat.

[7] Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

II Lokalna Komisja Etyczna
do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie przy
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji
Etycznej do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie
K. Sałat
prof. dr hab. Kinga Sałat

Podpis przewodniczącego komisji

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

1) Użytkownik,
2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

UCHWAŁA **NR 218/2020**

z dnia 06-08-2020

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą" po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie wpływu inhibitorów wybranych szlaków wewnątrzkomórkowych na efektywność stosowanych w klinice przeciwbólowych leków opioidowych w modelu bólu neuropatycznego u myszy" z dnia 29-07-2020 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków[1], zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę[2], przy udziale[3]: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ[4]

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków[5]: mysz domowa, szczep CD1, 768 szt., 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, dr Ewelina Rojewska, mgr Wioletta Makuch, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, Agnieszka Młynarczyk, mgr inż. Katarzyna Pawlik, mgr Joanna Bogacka.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie[6]: 01.09.2020 r. do 01.09.2024 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku[7]: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.

---

[1] Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

[2] Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

[3] Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

[4] Niewłaściwy zapis usunąć.

[5] Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

[6] Nie dłużej niż 5 lat.

[7] Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

9. Doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

§ 3

Uzasadnienie:

Celem badań jest określenie działania substancji modulujących interakcje neuroimmunologiczne oraz ich wpływ na leki przeciwbólowe stosowane w terapii bólu neuropatycznego. Zahamowanie ekspresji czynników pochodzenia immunologicznego może zwiększyć efektywność leków przeciwbólowych oraz umożliwić stosowanie niższych dawek tych leków, co pozwoli uniknąć występowania objawów niepożądanych.

Oczekiwanych wyników nie można osiągnąć bez wykorzystania zwierząt wymienionych we wniosku, gdyż nie ma możliwości odwzorowania skomplikowanych, patofizjologicznych mechanizmów zachodzących w obrębie układu nerwowego w sytuacji uszkodzenia nerwu, jakie występują u żywego osobnika, na hodowlach komórkowych lub modelach izolowanych, perfundowanych organów. W doświadczeniach zostaną przeprowadzone procedury określenia wpływu badanych substancji na modyfikację mechanizmów molekularnych z wykorzystaniem zwierzęcego modelu bólu neuropatycznego. Takie postawienie pytania wymaga całego organizmu i wszystkich elementów związanych z transmisją nocyceptywną. Stąd, jedyną możliwością uzyskania wiarygodnych wyników w doświadczeniu jest użycie zwierząt laboratoryjnych.

Plan doświadczenia uwzględnia zasadę 3R.

Dotkliwość procedur oszacowano prawidłowo.

Wniosek zawiera wszystkie informacje niezbędne do podjęcia decyzji.

Komisja zwraca uwagę na następujące uchybienia:

- W zadaniach badawczych nr 1 i 2 i odpowiadających im procedurach nie uwzględniono grupy myszy „naive". Taka grupa jest niezbędna do weryfikacji poprawności modelu CCI, który będzie wykorzystywany do badań. Być może niezaplanowanie takiej grupy było działaniem zamierzonym Autorki wniosku, jeśli nie – należy w dodatkowym wniosku o wykorzystanie takich zwierząt się zwrócić do II LKE.

- Wykazany w punkcie 2 staż pracy ze zwierzętami osoby planującej (25 lat) niezgodny ze stażem wykazanym w punkcie 8 wniosku (26 lat)

- Terminologia (nazewnictwo grup) powinna być w całości w języku polskim, a nie polsko-angielska - np. zamiast grupy „vehicle + oksykodon", należałoby napisać „rozpuszczalnik + oksykodon", zamiast „inhibitor szlaku EGF receptor tyrosine kinase" powinno być „inhibitor receptora kinazy tyrozynowej dla czynnika EGF", zamiast „test tail flick" (w tytułach czynności) – „test odsuwania ogona", itd.

- W punkcie 9. w części dotyczącej Udoskonalenia Komisja proponuje dopisanie informacji dotyczących wzbogacenia środowiska (są one częściowo zamieszczone w części C, jednak przede wszystkim powinny znajdować się przy opisie Udoskonalenia)

Powyższe nie stanowi przeszkody w udzieleniu zgody na realizację doświadczenia.

Podsumowując, w świetle przedstawionych we wniosku danych, jak również biorąc pod uwagę szkodliwość doświadczenia dla zwierząt oraz znaczenie oczekiwanych wyników, zgoda Komisji na wnioskowane badania jest uzasadniona. Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 (lub art.53, ust. 3) Ustawy (Dz. U. 2019, poz. 1392 ze zm.) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 miesięcy po jego zakończeniu.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

II Lokalna Komisja Etyczna
do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie przy
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków
(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Wiceprzewodnicząca II Lokalnej Komisji
Etycznej do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie
K. Sałat
prof. dr hab. Kinga Sałat

Podpis przewodniczącego komisji

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

1) Użytkownik,
2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

UCHWAŁA **NR 319/2021**

z dnia 28-10-2021

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą" po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie wpływu modulatorów szlaków wewnątrzkomórkowych - astaksantyny, artemizyniny, peiminy, fisetyny i bardoksolonu na efektywność analgetyczną morfiny, buprenorfiny i oksykodonu w mysim modelu bólu neuropatycznego" z dnia 20-10-2021 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków[1], zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę[2], przy udziale[3]: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ[4]

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków[5]: mysz domowa, stado CD1 IGS, 287 osobników, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, dr Ewelina Rojewska, mgr Wioletta Makuch, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, Agnieszka Młynarczyk, mgr inż. Katarzyna Pawlik.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie[6]: 29.10.2021 r. do 27.10.2026 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku[7]: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

§ 3

Uzasadnienie:

Zgodnie z art. 107 § 4 KPA, wobec uwzględnienia w całości wniosku strony, II Lokalna Komisja Etyczna odstępuje od uzasadnienia decyzji. Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.

---

[1] Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

[2] Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

[3] Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

[4] Niewłaściwy zapis usunąć.

[5] Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

[6] Nie dłużej niż 5 lat.

[7] Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

II Lokalna Komisja Etyczna
do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie przy
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji
Etycznej do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie
K. Sałat
prof. dr hab. Kinga Sałat

Podpis przewodniczącego komisji

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

1) Użytkownik,
2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

UCHWAŁA **NR 99/2022**

z dnia 07-04-2022

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą" po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie efektywności przeciwbólowej oraz wpływu na analgezję opioidową aktywatora kinazy PI-3 (740Y-P) w mysim modelu bólu neuropatycznego" z dnia 29-03-2022 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków[1], zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę[2], przy udziale[3]: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ[4]

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków[5]: mysz domowa, CD1 IGS (Albino Swiss), samce, 116 osobników, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, dr Ewelina Rojewska, mgr Wioletta Makuch, Agnieszka Młynarczyk, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, mgr inż. Katarzyna Pawlik.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie[6]: 07.04.2022 r. do 10.02.2026 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku[7]: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

---

[1] Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

[2] Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

[3] Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

[4] Niewłaściwy zapis usunąć.

[5] Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

[6] Nie dłużej niż 5 lat.

[7] Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

§ 3

Uzasadnienie:

Zgodnie z art. 107 § 4 KPA, wobec uwzględnienia w całości wniosku strony, II Lokalna Komisja Etyczna odstępuje od uzasadnienia decyzji.

Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

II Lokalna Komisja Etyczna
do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie przy
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji
Etycznej do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie
K. Sałat
prof. dr hab. Kinga Sałat

Podpis przewodniczącego komisji

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

1) Użytkownik,
2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

UCHWAŁA **NR 252/2023**

z dnia 18-01-2024

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą" po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie wpływu wielokrotnych podań astaksantyny na rozwój tolerancji morfinowej u samców w mysim modelu neuropatii cukrzycowej" z dnia 10-01-2024 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków[1], zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę[2], przy udziale[3]: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ[4]

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków[5]: mysz domowa, szczep CD1 IGS (Albino Swiss), samce, 196 osobników, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, mgr Wioletta Makuch, Agnieszka Młynarczyk, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie[6]: 22.01.2024 r. do 19.01.2029 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku[7]: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

---

[1] Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

[2] Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

[3] Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

[4] Niewłaściwy zapis usunąć.

[5] Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

[6] Nie dłużej niż 5 lat.

[7] Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

§ 3

Uzasadnienie:

Zgodnie z art. 107 § 4 KPA, wobec uwzględnienia w całości wniosku strony, II Lokalna Komisja Etyczna odstępuje od uzasadnienia decyzji.

Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

II Lokalna Komisja Etyczna
do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie przy
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji
Etycznej do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie
K. Sałat
prof. dr hab. Kinga Sałat

Podpis przewodniczącego komisji

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

1) Użytkownik,
2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

UCHWAŁA **NR 128/2023**

z dnia 29-06-2023

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą" po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie przeciwbólowego działania modulatora szlaków wewnątrzkomórkowych – astaksantyny w modelach bólu neuropatycznego u samców i samic myszy" z dnia 21-06-2023 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków[1], zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę[2], przy udziale[3]: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ[4]

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków[5]: mysz domowa, CD1 IGS (Albino Swiss), samice i samce, 572 osobniki, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, mgr Wioletta Makuch, Agnieszka Młynarczyk, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, mgr inż. Katarzyna Pawlik.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie[6]: 03.07.2023 r. do 01.07.2028 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku[7]: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

---

[1] Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

[2] Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

[3] Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

[4] Niewłaściwy zapis usunąć.

[5] Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

[6] Nie dłużej niż 5 lat.

[7] Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

§ 3

Integralną część niniejszej uchwały stanowi pismo wraz z załącznikami, o którym mowa w § 1.

II Lokalna Komisja Etyczna
do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie przy
[illegible] Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
[illegible]tna 12, 31-343 Kraków

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji
[illegible]cznej do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie
K. Sałat
prof. dr hab. Kinga Sałat

Podpis przewodniczącej komisji

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.
Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:
1) Użytkownik,
2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:
- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

UCHWAŁA **NR 124/2024**

z dnia 18-04-2024

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą" po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie przeciwbólowego działania astaksantyny podawanej podpajęczynówkowo w neuropatii cukrzycowej u samców i samic myszy" z dnia 10-04-2024 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków[1], zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę[2], przy udziale[3]: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ[4]

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków[5]: mysz domowa, szczep CD1 IGS (Albino Swiss), samce i samice, 146 osobników, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, mgr Wioletta Makuch, Agnieszka Młynarczyk, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, mgr Katarzyna Pawlik-Szczerba.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie[6]: 22.04.2024 r. do 18.04.2029 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku[7]: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

---

[1] Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

[2] Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

[3] Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

[4] Niewłaściwy zapis usunąć.

[5] Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

[6] Nie dłużej niż 5 lat.

[7] Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

§ 3

Uzasadnienie:

Zgodnie z art. 107 § 4 KPA, wobec uwzględnienia w całości wniosku strony, II Lokalna Komisja Etyczna odstępuje od uzasadnienia decyzji.

Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

II Lokalna Komisja Etyczna
do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie przy
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji
Etycznej do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie
K. Sałat
prof. dr hab. Kinga Sałat

Podpis przewodniczącego komisji

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

1) Użytkownik,
2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

UCHWAŁA **NR 75/2023**

z dnia 06-04-2023

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą" po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie wpływu wielokrotnych podań astaksantyny na rozwój tolerancji morfinowej u samców i samic w mysim modelu bólu neuropatycznego" z dnia 29-03-2023 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków[1], zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę[2], przy udziale[3]: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ[4]

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków[5]: mysz domowa, CD1 IGS (Albino Swiss), samice i samce, 260 osobników, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, mgr Wioletta Makuch, Agnieszka Młynarczyk, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, mgr inż. Katarzyna Pawlik.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie[6]: 07.04.2023 r. do 05.04.2028 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku[7]: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

---

[1] Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

[2] Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

[3] Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

[4] Niewłaściwy zapis usunąć.

[5] Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

[6] Nie dłużej niż 5 lat.

[7] Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

§ 3

Uzasadnienie:

Zgodnie z art. 107 § 4 KPA, wobec uwzględnienia w całości wniosku strony, II Lokalna Komisja Etyczna odstępuje od uzasadnienia decyzji.

Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

II Lokalna Komisja Etyczna
do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie przy
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji
Etycznej do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie
K. Sałat
prof. dr hab. Kinga Sałat

Podpis przewodniczącego komisji

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

1) Użytkownik,
2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

UCHWAŁA **NR 18/2023**

z dnia 23-03-2023

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą" po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie przeciwbólowego działania modulatorów szlaków wewnątrzkomórkowych - astaksantyny, fisetyny i bardoksolonu w mysim modelu bólu neuropatycznego u samców i samic" z dnia 15-03-2023 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków[1], zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę[2], przy udziale[3]: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ[4]

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków[5]: mysz domowa, CD1 IGS (Albino Swiss), samce i samice, 500 osobników, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, mgr Wioletta Makuch, Agnieszka Młynarczyk, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, mgr inż. Katarzyna Pawlik.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie[6]: 24.03.2023 r. do 21.03.2028 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku[7]: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

---

[1] Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

[2] Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

[3] Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

[4] Niewłaściwy zapis usunąć.

[5] Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

[6] Nie dłużej niż 5 lat.

[7] Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

§ 3

Uzasadnienie:

Zgodnie z art. 107 § 4 KPA, wobec uwzględnienia w całości wniosku strony, II Lokalna Komisja Etyczna odstępuje od uzasadnienia decyzji.

Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

II Lokalna Komisja Etyczna
do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie przy
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji
Etycznej do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie
K.Sałat
prof. dr hab. Kinga Sałat

Podpis przewodniczącego komisji

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

1) Użytkownik,
2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

UCHWAŁA **NR 153/2023**

z dnia 13-07-2023

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą" po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie wpływu astaksantyny na efektywność morfiny u samców i samic w mysim modelu bólu neuropatycznego" z dnia 05-07-2023 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków[1], zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę[2], przy udziale[3]: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ[4]

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków[5]: mysz domowa, CD1 IGS (Albino Swiss), samce i samice, 360 osobników, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, mgr Wioletta Makuch, Agnieszka Młynarczyk, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, mgr inż. Katarzyna Pawlik.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie[6]: 17.07.2023 r. do 15.07.2028 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku[7]: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

---

[1] Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

[2] Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

[3] Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

[4] Niewłaściwy zapis usunąć.

[5] Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

[6] Nie dłużej niż 5 lat.

[7] Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

§ 3

Uzasadnienie:

Wniosek rozpatrywany jest po raz pierwszy. Pochodzi z Instytutu Farmakologii im. J. Maja PAN w Krakowie. Celem badań podstawowych (układ nerwowy - PB[3]) jest określenie, czy astaksantyna – związek przeciwzapalny, antyoksydant i modulator wielu ścieżek sygnałowych, w tym tych, które są zaangażowane w proces nocyceptywny, wykazuje działanie przeciwbólowe w zwierzęcym modelu bólu neuropatycznego wywołanego podwiązaniem nerwu kulszowego (model CCI) oraz czy może ona wzmacniać przeciwbólowe działanie morfiny i redukować niekorzystne efekty wynikające z rozwijającej się tolerancji na morfinę.

Zaplanowano badania z wykorzystaniem 360 myszy CD-1 IGS, Albino Swiss obu płci, aby porównać efekt działania astaksantyny u samców i samic. Eksperymenty prowadzone będą 7. dnia od wywołania neuropatii. Zabieg CCI będzie wykonany w znieczuleniu ogólnym (3% izofluran w mieszance ze 100% tlenem). Do 3-go dnia po operacji zwierzęta otrzymywać będą opioidowy lek przeciwbólowy, butorfanol. Zaplanowane testy behawioralne do oceny progu bólowego to test von Frey'a i test zimnej płytki u myszy podanych działaniu astaksantyny w dawce 25 mg/kg podawanej pojedynczo lub w połączeniu z morfiną (schematy: (1) – jednorazowe podanie astaksantyny a po 30 min od jej podania iniekcja morfiny, (2) wielokrotne podanie morfiny w dawce 30 mg/kg przez 9 dni w celu wywołania tolerancji na jej działanie przeciwbólowe, a następnie – kiedy zostanie zaobserwowana tolerancja morfinowa – podanie astaksantyny przez około 10 kolejnych dni).

Badania mają być realizowane od dnia 17.07.2023 przez 5 lat (4 procedury). Są istotne naukowego i potencjalnie użytecznego punktu widzenia – poszerzą wiedzę na temat działania biologicznego astaksantyny i pozwolą oszacować jej potencjał kliniczny, w tym ocenić, czy może ona być przydatna jako związek osłabiający tolerancję morfinową. Organizacja badań uwzględnia zasadę 3R. Przewidziano zastosowanie wzbogacenia środowiska oraz wczesne humanitarne zakończenie procedury (inhalacja CO2 metodą stopniowego napełniania). Zaplanowanego doświadczenia nie można prowadzić bez użycia żywego organizmu. Najwyższa kategoria dotkliwości procedur to kategoria dotkliwa (ze względu na wywoływanie bólu u zwierząt). Po zakończonym doświadczeniu zwierzęta zostaną uśmiercone przez dekapitację w celu pobrania tkanek do badań biochemicznych.

Wniosek został przygotowany prawidłowo, komisja wyraża zgodę na realizację badań nim objętych. Jednocześnie komisja zwraca uwagę na konieczność bardziej racjonalnego planowania podobnych doświadczeń w przyszłości. Wnioskodawca ostatnim czasie złożył inne wnioski dotyczące badań aktywności biologicznej astaksantyny w innych modelach bólu neuropatycznego u samców i samic myszy (np. wniosek nr 128/2023 i wniosek 128/2023/P1). W niniejszym wniosku, podobnie jak w poprzednim, zaplanowano co prawda badania w różnych modelach bólu neuropatycznego, jednak we wszystkich tych doświadczeniach uwzględniono grupy kontrolne o dużej liczebności (n = 10) – myszy bez neuropatii. Wnioskodawca zaplanował uśmiercanie wszystkich zwierząt kontrolnych nieneuropatycznych, aby ocenić wybrane (te same we wszystkich doświadczeniach opisanych w tych wnioskach) parametry biochemiczne, m.in. aktywację mikrogleju. Powstaje zatem pytanie, czy rzeczywiście istnieje potrzeba uśmiercania wszystkich zwierząt kontrolnych w celu uzyskania obszernego materiału do badań ex vivo? Planując kolejne badania aktywności astaksantyny należy się zastanowić, czy części zwierząt kontrolnych nie można byłoby przekazać do adopcji w ramach programów znajdowania nowego domu.

Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.

§ 3

Integralną część niniejszej uchwały stanowi pismo wraz z załącznikami, o którym mowa w §1.

II Lokalna Komisja Etyczna
do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie przy
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji
Etycznej do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie
K. Sałat
prof. dr hab. Kinga Sałat

Podpis przewodniczącego komisji

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

UCHWAŁA **NR 242/2024**

z dnia 07-11-2024

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą" po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie wpływu astaksantyny na czynnik transkrypcyjny Nrf2 i kinureninazę 3-monooksygenową w mysim modelu bólu neuropatycznego wywołanym podwiązaniem nerwu kulszowego" z dnia 30-10-2024 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków[1], zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę[2], przy udziale[3]: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ[4]

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków[5]: mysz domowa, stado niekrewniacze CD1 IGS (Albino Swiss), samce, 100 osobników, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, mgr Wioletta Makuch, Agnieszka Młynarczyk, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, mgr Katarzyna Pawlik.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie[6]: 12.11.2024 r. do 10.11.2029 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku[7]: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

---

[1] Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

[2] Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

[3] Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

[4] Niewłaściwy zapis usunąć.

[5] Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

[6] Nie dłużej niż 5 lat.

[7] Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

§ 3

Uzasadnienie:

Zgodnie z art. 107 § 4 KPA, wobec uwzględnienia w całości wniosku strony, II Lokalna Komisja Etyczna odstępuje od uzasadnienia decyzji.

Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

II Lokalna Komisja Etyczna
do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie przy
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji
Etycznej do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie
K. Sałat
prof. dr hab. Kinga Sałat

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Podpis przewodniczącego komisji

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

1) Użytkownik,
2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

UCHWAŁA **NR 243/2024**

z dnia 07-11-2024

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą" po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Określenie roli receptora NMDA w przeciwbólowym działaniu astaksantyny" z dnia 30-10-2024 r., złożonego przez: Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, adres: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków[1], zaplanowanego przez: prof. dr hab. Joannę Mikę[2], przy udziale[3]: nie dotyczy, Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ[4]

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, układ nerwowy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwy.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków[5]: mysz domowa, stado niekrewniacze CD1 IGS (Albino Swiss), samce, 70 osobników, 32-38 dni.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: prof. dr hab. Joanna Mika, mgr Wioletta Makuch, Agnieszka Młynarczyk, mgr Katarzyna Ciapała, mgr Agata Ciechanowska, mgr Katarzyna Pawlik.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie[6]: 11.11.2024 r. do 09.11.2029 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku[7]: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy, w sposób: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

---

[1] Imię i nazwisko oraz adres i miejsce zamieszkania albo nazwę oraz adres i siedzibę użytkownika, który przeprowadzi to doświadczenie, z tym że w przypadku gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

[2] Imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia.

[3] Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

[4] Niewłaściwy zapis usunąć.

[5] Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju.

[6] Nie dłużej niż 5 lat.

[7] Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik.

§ 3

Uzasadnienie:

Zgodnie z art. 107 § 4 KPA, wobec uwzględnienia w całości wniosku strony, II Lokalna Komisja Etyczna odstępuje od uzasadnienia decyzji.

Na podstawie art. 53, ust. 1, pkt. 2 Ustawy (Dz. U. 2015, poz. 266) doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej 6 mies. po jego zakończeniu.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

II Lokalna Komisja Etyczna
do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie przy
Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji
Etycznej do Spraw Doświadczeń na
Zwierzętach w Krakowie
K. Sałat
prof. dr hab. Kinga Sałat

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Podpis przewodniczącego komisji

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

1) Użytkownik,
2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu