

# **Le chiavi del dolore. Storia della neurofarmacologia del dolore**

**Stefano Canali**

*Sapere*, 2003, 69, 2

Le attuali basi concettuali e metodologiche degli studi di neurobiologia del dolore e dell'analgesia vengono definite dal progressivo affinamento e dalla convergenza di due distinti filoni di indagine: gli studi di elettrofisiologia del dolore e dell'analgesia da un lato e la ricerca sulla farmacologia degli oppiati dall'altra. La confluenza tra questi due programmi di indagine si realizzava a partire dalla seconda metà degli anni '60 in parte sospinta dal processo di mutuo accostamento e in parte contribuendo alla reciproca assimilazione delle conoscenze sull'elettrofisiologia, sulla farmacologia, sulla patologie e la genetica molecolare del sistema nervoso centrale che doveva portare alla definizione delle neuroscienze come settore integrato di ricerca.

In particolare, la definizione della neurobiologia del dolore veniva in larga parte promossa dalla ricerca di una sostanza analgesica potente come la morfina ma priva del suo elevato potenziale d'abuso e dagli studi tesi all'individuazione di farmaci per il trattamento della dipendenza da oppiati.

Nel '50 tali sforzi avevano condotto alla sintesi di qualche migliaio di varianti molecolari della morfina e alla formulazione di numerose sostanze con azione morfina simile ma strutturalmente diverse dai derivati dell'oppio, come la meperidina scoperta nel 1939 (Eisbel e Schaumann, 1939) e il metadone nel 1946 (Scott e Chen, 1946), l'etorfina, analgesico diecimila volte più potente della morfina. Nel 1942, inoltre, Weijlard ed Erikson sintetizzavano la nalorfina, prima sostanza antagonista degli oppiati. Questo nuovo agente farmacologico era in grado di invertire alcuni effetti della morfina e dell'eroina come la depressione dei centri respiratori e faceva precipitare la sindrome d'astinenza. Allo stesso tempo, tuttavia, la nalorfina dimostrava evidenti proprietà analgesiche. Di segno opposto la sua azione sull'umore, inversa rispetto agli oppiati. La nalorfina produce infatti ansia e disforia e questi effetti non la rendono indicata per l'uso in clinica e la terapia del dolore, sintomo la cui natura è strettamente legata agli stati emotivi.

La ricerca sulla nalorfina portava tuttavia alla successiva messa a punto di nuovi e più potenti antagonisti degli oppiati, come il naloxone, nei primi anni '60 entrato nell'uso clinico, in particolare nel trattamento in acuto della sindrome d'astinenza e talora usato nella disintossicazione.

## **Serrature cerebrali del dolore. L'ipotesi dei recettori per le sostanze morfino-simili**

Il comportamento di questi agenti farmacologici suggeriva l'esistenza di una varietà di interazioni degli oppioidi col sistema nervoso verosimilmente mediate da una pluralità di modi di legarsi di questi farmaci ai recettori per gli oppiati, ovvero la presenza di diversi recettori per gli oppiati.

Il primo a proporre una spiegazione recettoriale della pluralità degli effetti degli oppioidi era negli anni '50 Arnold Beckett, allora giovane docente di farmacologia al Chelsea College di Londra. Beckett era convinto che il vasto spettro d'azione degli oppioidi fosse legato alla loro diversa capacità di adattarsi ed inserirsi nella struttura tridimensionale di recettori specializzati su specifiche cellule nervose. Ad una maggiore affinità recettoriale corrispondeva secondo Beckett una efficacia più elevata. Mentre l'antagonismo verso gli oppiati dipendeva da un tipo di legame col recettore che invece di produrre attivazione ne determinava il blocco.

Dal punto di vista teorico l'ipotesi forniva elegantemente un significato alle evidenze farmacologiche e rendeva estremamente interessante la ricerca su questi recettori. La scoperta e la determinazione della fisiologia dei recettori per gli oppiati, infatti, avrebbe aperto la via alla comprensione della patogenesi della tossicodipendenza ed eventualmente fornito le basi per la messa a punto di sostanze in grado di agire sul dolore e sull'umore senza produrre dipendenza ovvero capaci di curare la dipendenza al livello dei suoi meccanismi fondamentali. Per circa vent'anni dall'ipotesi di Beckett, la tecnologia degli strumenti di ricerca doveva rendere impossibile la dimostrazione sperimentale dell'esistenza di questi siti cellulari.

Il primo esperimento di localizzazione di eventuali siti di legame degli oppioidi sul cervello veniva effettuato nel 1970 da Vincent Dole, il medico americano che aveva introdotto l'uso del metadone nel trattamento delle dipendenze da eroina, in collaborazione con Ingolia. I due tentavano senza successo di mappare l'eventuale presenza di recettori per gli oppiati iniettando metadone nei ventricoli di ratto (Ingolia e Dole, 1970).

L'anno successivo, Avram Goldstein, direttore del dipartimento di farmacologia della Stanford University di Palo Alto in California, riusciva a mettere a punto una efficace tecnica di indagine per lo studio dei recettori e della loro interazione con le sostanze farmacologiche. La metodica consisteva nella separazione di frazioni cellulari (soma, dendriti, membrane) ottenuta attraverso la centrifugazione di tessuto cerebrale a diverse velocità e nella successiva esposizione di questi diversi prodotti di sedimentazione a un oppioide marcato radioattivamente. Il fissaggio del marcatore su questi diversi campioni di tessuto cerebrale indicava che una parte dell'oppioide si era legata a qualche frammento cellulare, a un particolare recettore.

La tecnica "*grind and bind*" (frazionamento e fissaggio) di Goldstein, tuttavia, doveva scontrarsi con problemi oggettivi piuttosto complessi. Innanzitutto, la bassissima presenza relativa dei recettori per gli oppiacei nel cervello rendeva difficile il rilevamento dei segnali radioattivi provenienti dai legami recettoriali effettivamente fissati. A complicare le difficoltà delle misurazioni c'era poi la tendenza degli oppiacei marcati a legarsi in maniera aspecifica nei tessuti ricchi di lipidi. Per risolvere quest'ultimo problema Goldstein ideava un ingegnoso accorgimento farmacologico in grado di rilevare soltanto i legami stereospecifici, quelli verosimilmente in gioco nell'interazione tra farmaco e recettore. I risultati di Goldstein, tuttavia, restavano piuttosto deludenti. Meno del 2% dell'oppioide marcato si legava alle emulsioni di cervello, una percentuale troppo bassa per dimostrare l'esistenza di recettori specifici. Ciononostante, la metodica di Goldstein e il suo concetto di stereospecificità nel legame tra gli ipotetici recettori e gli oppiati

ponevano le basi per la soluzione del problema. Iniziava così il rush finale verso la scoperta dei recettori per gli oppiati.

### **La dimostrazione dell'esistenza dei recettori per gli oppiati**

Lo stesso anno in cui Goldstein pubblicava il saggio sulle interazioni stereospecifiche degli oppiati e il metodo del frazionamento e fissaggio, altri gruppi di indagine avviavano la ricerca sui recettori delle sostanze morfino-simili. Tra questi spiccavano quello di Eric Simon, alla New York University; il gruppo di Lars Terenius all'istituto di farmacologia dell'Università di Uppsala e il team di ricercatori messo su da Solomon Snyder alla John Hopkins University di Baltimora.

Simon aveva già collaborato nel 1965 ad uno studio sui meccanismi d'azione degli oppiati condotto con nalorfina marcata radioattivamente. Terenius invece, allora giovane cattedratico, era passato alla ricerca sui recettori per gli oppiati da pionieristiche indagini sulla localizzazione dei recettori per gli ormoni sessuali (Terenius, 1972a, 1972b). Mentre Snyder, famoso psichiatra famoso per i suoi studi sulla farmacologia della depressione (Hendley e Snyder, 1968), della schizofrenia (Baldessarini e Snyder, 1965; Snyder et al., 1972; Snyder, 1973) e le sue indagini sui meccanismi d'azione delle sostanze d'abuso (Snyder et al., 1967; Snyder et al., 1970; Snyder et al., 1971), inaugurava la ricerca sugli oppiati al dipartimento di farmacologia e terapia sperimentale della John Hopkins University contando su un finanziamento federale per la lotta alle tossicodipendenze,

Snyder incaricava della ricerca Candace Pert, ventiquattrenne neo-laureata in biologia ed otteneva la collaborazione di Pedro Cuatrecasas, un biochimico molto noto per importanti studi sui recettori dell'insulina (Cuatrecasas, 1971; 1972). Ad una delle riunioni mensili del Dipartimento, Snyder aveva sentito Cuatrecasas descrivere il funzionamento del collettore multiplo per la filtrazione rapida, il dispositivo che quest'ultimo aveva messo a punto nel 1968 per la ricerca sull'insulina. I due si accordarono per applicare la tecnica di Cuatrecasas alla ricerca sugli oppiati. Il procedimento venne così adattato per identificare i recettori degli oppioidi e la Pert fu in grado di padroneggiare la tecnica verso la metà del 1972. Per alcuni mesi la Pert provò senza successo a fissare vari oppioidi marcati sulle emulsioni di cervello di diversi animali. Passava quindi ad utilizzare il naloxone un oppioide-antagonista dotato di elevata potenza nel contrastare gli effetti della morfina e dell'eroina e quindi verosimilmente caratterizzata da elevata affinità per i recettori di cui si ipotizzava l'esistenza. Questo faceva del naloxone una sostanza ideale da testare con la tecnica dell'autoradiografia, in quanto era possibile usarne quantità minime e quindi attenuare il disturbo di fondo legato al marcatore radioattivo e gli eventuali legami aspecifici.

Il 21 settembre 1972, Candace Pert leggeva i dati dello scintillatore. Il 66% del naloxone si era legato all'omogenato di cervello. Era la prova dell'esistenza di recettori per gli oppiati. Sulla base di questo dato la Pert indagava quindi gli aspetti della competizione degli le sostanze morfino-simili per i recettori degli oppiati, appurando che la loro potenza farmacologica era correlata all'affinità verso i recettori, cioè al grado di complementarità e stereospecificità molecolare rispetto al sito cellulare di legame.

Nel timore di venir battuti dagli altri gruppi di ricerca, Snyder e la Pert decidevano di dare immediatamente la notizia con una serie di comunicati e conferenze stampa che venivano riprese con numerosi titoli a sensazione sui quotidiani, mentre la comunicazione scientifica usciva su *Science* il 9 marzo 1973. Lo stesso anno uscivano i lavori di Simon (Simon, Hiller, Edelman, 1973) e Terenius (1973) sulla dimostrazione della presenza dei recettori degli oppiati nel cervello. Una breve nota sulla dimostrazione dei recettori per gli oppiati era stata pubblicata il 6 novembre 1972 da Terenius come lettera sulla rivista *Acta of pharmacological Toxicology*. La comunicazione però era troppo scarna e non compiutamente documentata per rappresentare una priorità scientifica.

Si era arrivati ad una scoperta eccezionale. Al di là del significato implicito nell'individuazione di un recettore, cosa straordinariamente complessa trent'anni fa, il valore dei risultati degli studi dei tre gruppi di ricerca concorrenti stava nel fatto che per la prima volta veniva dimostrata la presenza di un recettore per una sostanza psicoattiva, per di più centrale nella biologia del dolore e della dipendenza verso gli oppiati. La dimostrazione della presenza dei recettori per gli oppiati nel tessuto nervoso prefigurava così la possibilità di sviluppare sostanze ad elevata affinità verso i recettori, magari in grado di attivare i processi legati all'analgesia e alla modulazione dell'umore ma prive di potenziale d'abuso.

### **Le prime ipotesi sull'esistenza degli oppioidi endogeni**

La scoperta dei recettori per gli oppiati nel tessuto nervoso sollevava un problema teorico fondamentale, quello delle ragioni della presenza nel cervello di strutture di legame stereospecifiche per i derivati dell'oppio. Era evidente che doveva esistere una sostanza endogena capace di legarsi ai recettori per gli oppioidi e dare avvio alla cascata di eventi culminanti nell'analgesia. Questa idea era stata concepita sin dagli anni '60 da un altro degli attori dell'epopea iniziale della ricerca sugli oppioidi, Hans Kosterlitz.

Kosterlitz insegnava farmacologia clinica all'Università di Aberdeen da quando era dovuto fuggire dalla Germania per le persecuzioni antisemite di Hitler. Era noto per aver introdotto l'uso dell'ileo di cavia nella ricerca preclinica sugli oppiati (Gyand e Kosterlitz, 1966). Isolato e stimolato da corrente elettrica, l'ileo si contrae in modo ritmico e le contrazioni possono essere agevolmente conteggiate. Kosterlitz aveva accertato che la morfina e gli oppiati in generale riducono le contrazioni dell'ileo di cavia in misura proporzionale alla loro efficacia analgesica nell'uomo. L'osservazione del comportamento dell'ileo di cavia sotto l'azione degli oppiati suggeriva secondo Kosterlitz che questa si esplicasse sulla modulazione del tono di attività della cellula piuttosto che sui meccanismi della trasmissione, a livello sinaptico. Sembrava quindi mimare l'azione dei neuropeptidi, sostanze endogene neuromodulatrici, che erano state scoperte a partire dalla metà degli anni '50.

All'inizio degli anni '70, l'idea di Kosterlitz era stata fatta propria dal suo vice al Marishal College, presso il neonato istituto per lo studio sui farmaci d'abuso, John Hughes. Servendosi dell'ileo di cavia come strumento, Hughes aveva iniziato a testare estratti di cervello nel tentativo di isolare e identificare la natura della sostanza endogena morfino-simile ipotizzata da Kosterlitz.

### *Analgesia elettrica, analgesia farmacologica. Due o una?*

Frattanto, nel 1962, due biologi cinesi, Kang Tsou e Jang avevano terminato un'indagine volta a localizzare i siti di azione degli oppiati sul sistema nervoso centrale (i risultati saranno pubblicati in inglese due anni più tardi, Tsou e Jang, 1964). Somministrando morfina direttamente nel cervello con una nuova tecnica di microiniezione, i due avevano accertato che tale sostanza agisce su un piccolo gruppo di neuroni localizzato in una regione encefalica profonda in prossimità del quarto ventricolo e dell'acquedotto mesencefalico: la sostanza grigia periacquedottale (SGP).

Nello stesso solco venivano casualmente indirizzate le indagini che lo psicologo John Liebeskind e il suo gruppo di ricerca stavano conducendo all'Università della California di Los Angeles. Tentando di rilevare l'eventuale ruolo degli stimoli dolorosi nell'apprendimento attraverso la stimolazione intracranica, Liebeskind e collaboratori scoprivano che la stimolazione della SGP induceva un'analgesia del tutto simile a quella provocata dalla morfina. Ratti con elettrodi cronicamente impiantati in tale regione reagivano a tutti gli stimoli eccetto quelli nocicettivi (Mayer et al., 1971). Cercando nella letteratura utile a comprendere meglio questa evidenza, il gruppo di Liebeskind leggeva l'articolo di Tsou e Jang. Sulla base dell'esperimento dei due cinesi, Huda Akil, una delle ricercatrici di Liebeskind, decideva di studiare l'analgesia da stimolazione della SGP come fosse prodotta da un oppioide. L'idea era di accertare la possibilità di bloccare l'analgesia indotta elettricamente con la somministrazione di un antagonista degli oppiati. Se ciò fosse avvenuto si sarebbe dimostrato che l'analgesia elettrica e quella indotta farmacologicamente dagli oppiati dipendevano da una comune base biologica. In effetti la Akil dimostrava che la nalorfina e successivamente il naloxone, un antagonista degli oppiati ancora più potente, erano in grado di annullare gli effetti analgesici della stimolazione della SGP (Akil et al., 1972). La Akil interpretava questi risultati ipotizzando semplicemente che l'analgesia da stimolazione elettrica e l'antagonista degli oppiati agissero su una comune base anatomica, su uno stesso sistema neuronale. Non così faceva Kosterlitz che appena letto l'articolo della Akil aveva discusso con Hughes sul fatto che quei risultati indicavano con tutta probabilità che la stimolazione elettrica liberava un oppioide endogeno la cui azione veniva poi bloccata dal naloxone.

### **Dalla sostanza X alle encefaline**

Il lavoro della Akil contribuiva così a precisare il programma di ricerca del gruppo di Kosterlitz e Hughes ad Aberdeen. Il progetto di studio era lineare ed elegante. L'ipotesi era l'esistenza di un oppioide endogeno. Ora, se questa sostanza biologica fosse davvero esistita dovevano verificarsi due semplici situazioni sperimentali: 1) la sostanza avrebbe dovuto inibire le contrazioni dell'ileo di cavia o del vas deferens, un tessuto che reagiva allo stesso modo alla morfina; 2) l'inibizione indotta da questa sostanza doveva essere bloccata dal naloxone, cosa che avrebbe dimostrato conclusivamente che essa era un oppioide.

Hughes iniziava così a filtrare quantità di cervello di cavia e a testare sull'ileo e sul vas deferens gli estratti proteici, le frazioni cellulari verosimilmente candidate al ruolo di neuromodulatori del dolore e dell'analgia. Nell'agosto 1973 Hughes trovava un estratto attivo sul vas deferens, in grado cioè di inibire le contrazioni prodotte elettricamente. Il naloxone tuttavia antagonizzava troppo debolmente la sua azione. Ciò pertanto non soddisfaceva sufficientemente la seconda delle due condizioni fattuali necessarie per provare l'esistenza di una morfina endogena.

Hughes era però convinto di essere sulla strada giusta. Passava così alla ricerca sul cervello dei maiali, ripetendo la procedura che aveva portato all'estrazione del composto attivo, nel frattempo soprannominato sostanza X. Il protocollo veniva in parte modificato sulle base di alcuni ragionamenti farmacologici sviluppati con Kosterlitz. Se la sostanza attiva era affine alla morfina allora come quest'ultima doveva avere un basso peso molecolare, andavano così utilizzate colonne per la filtrazione più piccole e a scambio ionico. L'uso di tali apparati permetteva quindi di accertare che la sostanza X aveva una carica elettrica negativa molto piccola ed inferiore a quella di ogni altro neurotrasmettitore conosciuto.

Nei primi mesi del 1974, Lars Terenius, invitato ad Aberdeen da Kosterlitz per un soggiorno di studio, aggiungeva un altro importante tassello concettuale alle ipotesi che andava indirizzando la ricerca di Hughes. Tentando di abbozzare la forma tridimensionale della sostanza X, Hughes si era convinto che la frazione molecolare di legame di questo agente endogeno con i recettori fosse costituita da un anello di atomi di carbonio, simile a quello della morfina. Terenius invece ipotizzava che la sostanza X fosse un peptide una corta catena di aminoacidi. L'ipotesi di Terenius implicava un nuovo vincolo sperimentale che dava una precisa indicazione di ricerca. Se la sostanza X fosse stata un peptide allora le peptidasi, un gruppo di enzimi che inattivano e demoliscono le catene proteiche, l'avrebbero digerita e così annullato la sua capacità di inibire le contrazioni del vas deferens.

I risultati e le ipotesi del gruppo di ricerca di Aberdeen venivano esposti nel maggio 1974 al Boston Neurosciences Research Program, convegno imperniato sul tema dei recettori per gli oppiati da poco scoperti ed in cui erano presenti tutti i più importanti studiosi del problema (Neurosciences Research Program, 1975) e pubblicati alcuni mesi dopo su *Brain Research* (Hughes, 1975). La relazione di Hughes scatenava così una nuova competizione, sia per l'importanza scientifica dell'eventuale definizione della struttura chimica della sostanza individuata da Hughes, sia per l'enorme potenzialità economica insite nella produzione industriale e nella commercializzazione di una molecola analgesica di natura endogena.

Snyder dava incarico a Gavril Pasternak di lavorare alla ricerca per l'isolamento dell'oppioide endogeno. Sulla base della descrizione delle caratteristiche e del protocollo per l'estrazione della sostanza X date da Hughes a Boston, Pasternak elaborava un metodo semplificato che lo portava rapidamente ad ottenere dal cervello di vitelli un oppioide endogeno uguale a quello cui erano arrivati ad Aberdeen e che venne denominato *Morphine-Like Factors* (fattore morfino-simile) o brevemente MLF (Pasternak, Goodman e Snyder, 1975). La sostanza veniva quindi testata con la tecnica autoradiografica messa a punto da Candace Pert per accertare se competeva con il naloxone per gli stessi recettori :

un metodo più sofisticato, ma meno rapido e funzionale per verificare la sua natura di sostanza oppioide rispetto a quello del vas deferens. Nei confronti di quest'ultima tecnica, tuttavia, il metodo di Pasternak aveva il vantaggio di permettere la localizzazione dei siti di interazione della sostanza morfino-simile. La mappatura del fattore morfino-simile nel tessuto nervoso portava Pasternak a dimostrare che l'MLF si distribuiva in maniera organica e regolare, analogamente agli altri neurotrasmettitori (Pasternak, Snowman e Snyder, 1975) e quindi che tale sostanza rappresentava il mediatore di un sistema funzionale verosimilmente deputato alla modulazione del dolore e dell'analgesia.

Nello stesso periodo, il gruppo di Avram Goldstein, che frattanto aveva inaugurato l'Addiction Research Foundation a Palo Alto, rilevava un'attività morfino-simile di un campione grezzo di ormone adrenocorticotropo (ACTH) sul vas deferens. Nei mesi successivi le ricerche sull'ACTH davano risultati negativi e diveniva chiaro che il campione rivelatosi attivo conteneva in realtà due sostanze oppioidi cui Goldstein dava il nome di *Pituitary Opioid Peptide 1* e *2* (POP-1 e POP-2) (Teschemacher, Opheim, Cox, Goldstein, 1975; Cox, Opheim, Teschemacher, Goldstein, 1975). I due peptidi oppioidi ipofisari trovati da Goldstein erano piuttosto diversi dalla sostanza X di Hughes, dal novembre 1974 ribattezzata encefalina, dalle parole greche *en*, in, *kefalé*, testa. Avevano un peso molecolare molto più elevato, ma, come per l'encefalina, la composizione e la struttura chimica erano del tutto imprecise. Queste differenze secondo Goldstein suggerivano che il sistema dell'analgesia funzionava per mezzo di una famiglia di sostanze morfino-simili, piuttosto che con un unico mediatore chimico. A questo proposito è considerato il moltiplicarsi degli oppioidi individuati nei tessuti cerebrali, nel maggio 1975, durante il quindi convegno dell'International Narcotic Research Club (INRC) ad Airlie House, in Virginia, Eric Simon proponeva di indicare col termine generico endorfine tutte le sostanze endogene con attività morfino-simile.

Anche Terenius faceva importanti passi avanti in questa ricerca. Durante gli stessi lavori dell'INRC egli comunicava che in collaborazione coi suoi ricercatori, aveva osservato nel liquido cefalorachidiano di alcuni soggetti affetti da sindrome del dolore cronico livelli più bassi di una sostanza oppioide non bene identificata (Terenius e Wahlstrom, 1975a e 1975b; Almay et al., , 1978). Era la prima ricerca che collegava i dati sugli oppioidi endogeni alla clinica, al dolore negli uomini.

Ma la comunicazione più importante ed attesa era quella di Hughes in cui si descriveva per la prima volta, anche se in forma parziale, la struttura chimica dell'encefalina (International Narcotic Research Club, 1975). Hughes aveva coinvolto nell'impresa la Reckitt and Colman Drug Company, una piccola industria farmaceutica inglese, per accelerare il processo di estrazione in forma pura dell'encefalina e Linda Fothergill, biochimico nella stessa facoltà di Hughes ad Aberdeen, per l'analisi chimica della sostanza con la cromatografia.

### **La decifrazione della composizione chimica delle encefaline**

Immediatamente dopo l'INRC, il lavoro del gruppo di Aberdeen accelerava, venivano identificati definitivamente quattro aminoacidi e composta la sequenza parziale: tirosina-glicina-glicina-fenilalanina. Il mese successivo subentrava però

uno stallo. La marcatura del quinto aminoacido della sequenza iniziava a dare risultati controversi. Alcuni campioni di encefalina sembravano presentare la metionina, altri la leucina. Al di là di questa anomalia, appariva problematica l'idea che una sostanza tanto semplice, di così pochi aminoacidi, fosse potente a tal punto, nei modelli teorici cui aveva lavorato, Hughes prevedeva una catena peptidica di almeno dieci aminoacidi. La soluzione del problema arrivava con l'ingresso nel gruppo di ricerca di Howard Morris, un giovane studioso della Cambridge Medical School. Morris era già noto per aver scoperto un aminoacido fondamentale della protrombina, un fattore di coagulazione del sangue, usando lo spettrometro di massa (Magnusson et al., 1974) e per altri importanti studi sui peptidi condotti (Dell e Morris, 1974; Bridgen e Morris, 1974) con la stessa tecnologia.

La prima spettrografia di massa dell'encefalina veniva eseguita nell'agosto 1975. I risultati si sovrapponevano a quelli ottenuti dalla Fothergill con la cromatografia, anche per l'alternante occorrenza della leucina e della metionina. Una serie di tentativi volti a chiarire la natura e le ragioni di questa anomalia in posizione cinque portavano infine a sciogliere l'apparente ambiguità dei segnali resi dal cromatografo e dallo spettrometro di massa. Essa dipendeva dal fatto che si tentava di interpretare i dati nella convinzione di aver a che fare con una sola encefalina. Si stavano invece osservando due catene molto corte di aminoacidi, perfettamente uguali per i primi quattro elementi della catena peptidica, tranne che per il quinto ed ultimo, in un caso appunto la leucina, nell'altro la metionina. Immediatamente dopo l'identificazione delle due encefaline si passò alla loro sintesi per poter verificare la loro attività sul vas deferens e l'antagonismo col naloxone e così provare conclusivamente la loro natura di oppioidi. Nell'ottobre 1975 la met-encefalina sintetica veniva provata con successo: il gruppo di Aberdeen era arrivato alla determinazione chimica delle due prime endorfine, il 18 dicembre *Nature* ne ufficializzava la notizia a livello internazionale (Hughes, Smith, Kosterlitz, Fothergill, Morgan, Morris, 1975).

La conclusione di questa competizione straordinaria segnava l'inizio di un eccezionale periodo di indagine sulla biologia dell'analgesia e della dipendenza da oppioidi e con esso dava impulso ad una revisione profonda nella modellizzazione dei meccanismi del cervello e delle sue funzioni, inaugurando di fatto una nuova fase nell'evoluzione delle neuroscienze.

## **Bibliografia**

Akil H, Mayer DJ, Liebeskind JC, Comparaison chez le rat entre l'analgésie induite par stimulation de la substance grise périaqueducule et l'analgésie morphinique C. R. Acad. Sci. (Paris) 1972, 274: 3603-3605.

Almay BG, Johansson F, Von Knorring L, Terenius L, Wahlstrom A. Endorphins in chronic pain. I. Differences in CSF endorphin levels between organic and psychogenic pain syndromes. Pain. 1978 Aug;5(2):153-62.

Baldessarini RJ, Snyder SH. Schizophrenia. A critique of recent genetic-biochemical formulations. Nature. 1965 Jun 12;206(989):1111-2.

Bridgen J, Morris HR. Use of mass spectrometry and quantitative Edman degradation for the determination of repeating amino-acid sequences. *Eur J Biochem.* 1974 May 15;44(2):333-4.

Cox BM, Opheim KE, Teschemacher H, Goldstein A. A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. 2. Purification and properties. *Life Sci.* 1975 Jun 15;16(12):1777-82.

Cuatrecasas P. Insulin--receptor interactions in adipose tissue cells: direct measurement and properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971 Jun;68(6):1264-8.

Cuatrecasas P. The insulin receptor. *Diabetes.* 1972;21(2 Suppl):396-402.

Dell A, Morris HR. New observations on the fragmentation properties of peptides under electron impact mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974 Dec 23;61(4):1125-32.

Eisbel O, Schaumann O, Dolantin, ein neuartiges Spasmolytikum und Analgetikum). *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 1939, 65:24, p. 967-968.

Goldstein, A.; Lowney, L.I. and Pal, B.K. Stereospecific and non stereospecific interactions of the morphine congener levorphanol in sub cellular fractions of mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1971 68: 1742-1747.

Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M. and Hood, L. Dynorphin-(1-13), an extraordinary potent opioid peptide. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1979 76: 6666-6670.

Gyand EA, Kosterlitz HW Agonist and antagonist actions of morphine-like drugs on the guinea-pig isolated ileum *Br. J. Pharmacol.* 1966 27: 514-527.

Hendley ED, Snyder SH. Relationship between the action of monoamine oxidase inhibitors on the noradrenaline uptake system and their antidepressant efficacy. *Nature.* 1968 Dec 28;220(174):1330-1.

Hughes J, Isolation of an endogenous compound from the brain with properties similar to morphine. *Brain Research* 1975 (a), 88: 295-308.

Hughes J, Search for the endogenous ligand of the opiate receptors. *Neuroscience Research Program Bulletin* 1975 (b), 13: 55-58.

Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-582 (1975).

Ingolia NA, Dole VP. Localization of d- and l-methadone after intraventricular injection into rat brains. *J Pharmacol Exp Ther.* 1970 Oct;175(1):84-7.

International Narcotic Research Club, *The opiate narcotics : neurochemical mechanisms in analgesia and dependence.* A cura di Avram Goldstein, Atti the International Narcotic Research Club conference, May 21-24, 1975, Airlie House, Virginia, Pergamon Press, New York, 1975.

Magnusson S, Sottrup-Jensen L, Petersen TE, Morris HR, Dell A. Primary structure of the vitamin K-dependent part of prothrombin. *FEBS Lett.* 1974 Aug 25;44(2):189-93.

Mayer DJ, Wolfle TL, Akil H, Carder B, Liebeskind JC. Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. *Science.* 1971 Dec 24;174(16):1351-4.

Neurosciences Research Program, *Opiate receptor mechanisms*; based on an NRP work session held May 19-21, 1974, and updated by participants, by Solomon H. Snyder and Steven Matthyse with Huda Akil, Neurosciences Research Program bulletin, v. 13, no. 1 Boston, 1975.

Pasternak GW, Goodman R, Snyder SH. An endogenous morphine-like factor in mammalian brain. *Life Sci.* 1975 Jun 15;16(12):1765-9.

Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science.* 1973 Mar 9;179(77):1011-4.

Scott CC, Chen KK, The action of 1,1-diphenyl-1-(dimethylaminoisopropyl)-butanone-2, a potent analgesic agent. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1946, 87:1, p. 63-71; *Federation Proceedings*, 1946, 5:1, p. 201

Simon EJ, Hiller JM, Edelman I, Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) etorphine to rat brain homogenate. *Proceedings National Academy of Science USA* 1973, 70: 1947-1949.

Snyder SH, Faillace L, Hollister L. 2,5-dimethoxy-4-methyl-amphetamine (STP): a new hallucinogenic drug. *Science.* 1967 Nov 3;158(801):669-70.

Snyder SH, Taylor KM, Coyle JT, Meyerhoff JL. The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs. *Am J Psychiatry.* 1970 Aug;127(2):199-207

Snyder SH, Weingartner H, Faillace LA. DOET (2,5-dimethoxy-4-ethylamphetamine), a new psychotropic drug. Effects of varying doses in man. *Arch Gen Psychiatry.* 1971 Jan;24(1):50-5.

Snyder SH, Aghajanian GK, Matthyse S. Prospects for research on schizophrenia. V. Pharmacological observations, Drug-induced psychoses. *Neurosci Res Program Bull.* 1972 Nov;10(4):430-45.

Snyder SH. Amphetamine psychosis: a "model" schizophrenia mediated by catecholamines. *Am J Psychiatry.* 1973 Jan;130(1):61-7.

Terenius L. Specific progesterone binder in uterus of normal rats. *Steroids.* 1972 Jun;19(6):787-94.

Terenius L. Hexoestrol analogues as probes of oestrogen receptors. II. Importance of hydrogen-bonding groups for binding to uterine tissue and for uterotrophic activity. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1972;31(5):449-55.

Terenius L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacological Toxicology* 1973, 32: 317-320.

Terenius L, Wahlstrom A. Search for an endogenous ligand for the opiate receptor. *Acta Physiol Scand.* 1975a May;94(1):74-81.

Terenius L, Wahlstrom A. Morphine-like ligand for opiate receptors in human CSF. *Life Sci.* 1975b Jun 15;16(12):1759-64.

Teschemacher H, Opheim KE, Cox BM, Goldstein A.A. peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. I. Isolation. *Life Sci.* 1975 Jun 15;16(12):1771-5.

Tsou K, Jang CS 1964 Studies on the site of analgesic action of morphine by intracerebral microinjection. *Scientia Sinica* 13:1099-1109. Lavoro originariamente pubblicato nel 1962 in cinese.

**Stefano Canali**