



Медицински университет, Медицински факултет
Катедра по фармакология и токсикология
ул. „Здраве” № 2, 1431 София, ☎ (02) 91-72-714

Д-р Николай Светославов Янев

**МЕХАНИЗЪМ НАСОЧЕНО ЛЕЧЕНИЕ НА БОЛКАТА:
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ И
ФАРМАКОЛОГИЧНИ ВЪЗДЕЙСТВИЯ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**на дисертационен труд за придобиване
на образователна и научна степен
„доктор по медицина”**

Направление: 7. Здравеопазване и спорт
Професионално направление: Медицина
Научна специалност: Фармакология
(вкл. Фармакокинетика и химиотерапия)

Научен ръководител

Чл.-кор. проф. д-р Мила Власковска, дм, дмн

Научен консултант

Доц. д-р Славина Кирилова Сурчева, дм

Рецензенти

Акад. Евгени Головински, дбн
Проф. д-р Красимира Якимова, дм, дмн

София • 2011

Дисертационният труд се състои от 112 страници и е онагледен с 37 фигури и с 3 таблици.

Библиографията включва 185 литературни източника, от които 13 на кирилица и 172 на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 30 ноември 2011 г. от 16.00 часа, в зала № 306 на Катедрата по Фармакология и токсикология на МФ – София, ул.Здраве № 2, съгласно чл. 76 и 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София и въз основа на Заповед № Р-1525/26.10.2011 г. на Ректора на МУ – София, пред научно жури в състав:

Председател:

Проф.д-р Красимира Якимова дм, дмн

Членове:

Акад.Евгени Головински дбн
Проф д-р Ирен Белчева дм, дмн
Проф.д-р Мила Власковска дм, дмн
Доц.д-р Иван Ламбев дм

Резервни членове:

Доц.д-р Славина Сурчева дм
Доц.д-р Симеон Тодоров дм

Материалите по защитата са на разположение в Катедра „Фармакология и токсикология” на Медицински факултет, Медицински университет – София, и са публикувани на интернет страницата на МУ – София.

БЛАГОДАРНОСТ

Бих желал да изкажа искрена и дълбока благодарност на моя научен ръководител, чл.-кор. проф. д-р Мила Власковска дмн, която ме привлече към научните разработки и постижения в своята професионална област още по време на първите ни срещи като студент по стоматология. Проф. Власковска сподели с желание и готовност огромния си научноизследователски опит и авторитет, поради това за мен бе изключителен шанс да бъда приет в групата на нейните докторанти, което освен висока школа е и голяма отговорност.

Изключително съм признателен на моя научен консултант, доц. д-р Славина Сурчева дм, която през всички години на разработване на дисертационния труд бе до мен и не пожали своите сили и време.

С респект и уважение поднасям своята благодарност и признателност на проф. д-р Любомир Казаков дмн, и проф.д-р Лъчезар Сурчев дмн, които ми гласуваха доверие и подпомогнаха в провеждането на съвместни експерименти.

Сърдечна признателност отправям към проф. д-р Красимира Якимова дмн и целия колектив на Катедрата по фармакология и токсикология на МФ – София, които ме приеха най-добронамерено като задочен докторант преди години и ми помогнаха с ценни професионални съвети, за да успее да завърша настоящия труд. Голяма подкрепа в годините получих и от доц. д-р Иван Ламбев дм, чийто изключителен принос в научната и професионална информация не само в областта на фармакологията, а и в медицината въобще, всички познаваме и ползваме ежедневно.

Изказвам изключителна благодарност на всички мои колеги от Специализираната болница за активно лечение по Лицево-челюстна хирургия, начело с нейния управител доц.д-р Росен Коларов дм, които ми дадоха своята подкрепа за дългогодишни образователни и научни проекти , за което съм дълбоко признателен.

Бих искал да отправя благодарност и към уважаемите рецензенти – проф. д-р Красимира Якимова дмн, акад. Евгений Головински дбн, и уважаемите членове на Научното жури – чл.-кор. проф. д-р Мила Власковска дмн, проф. д-р Ирен Белчева дмн, и доц. д-р Иван Ламбев дм.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	7
ВЪВЕДЕНИЕ	9
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	13
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	15
I. IN VIVO ЕКСПЕРИМЕНТИ	15
A. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ.....	15
1. Модел на невропатична болка.....	15
2. Модели на ноцицептивна болка	16
2.1. Остра хирургична болка	16
2.2. Остра карагенинова възпалителна хипералгезия	17
2.3. Хронична възпалителна хипералгезия при адювантен артрит на Фройнд	17
3. Модел на хипертермична реакция	18
B. ТЕСТОВЕ ЗА ОТЧИТАНЕ НА НОЦИЦЕПТИВНИ/АЛОДИНИЧНИ ПРОЯВИ.....	18
1. INCAPACITANCE TEST.....	18
2. PAW PRESSURE TEST	20
3. TAIL-FLICK TEST.....	21
4. HOT PLATE TEST.....	21
5. PLANTAR HEAT TEST.....	22
6. VON FRAY TEST.....	23
7. PLETHYSMOMETRY.....	24
II. EX VIVO/IN VITRO МЕТОДИ	25
1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЛЕВКОЦИТНАТА ИНФИЛТРАЦИЯ И НИВАТА НА P _g E ₂ ПРИ КАРАГЕНИН ИНДУЦИРАНО ВЪЗПАЛЕНИЕ	25
2. ХИСТОМОРФОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ КОНСТРИКТИВНАТА УВРЕДА НА СЕДАЛИЩНИЯ НЕРВ.....	25
СТАТИСТИЧЕСКА ОБРАБОТКА	26
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РЕЗУЛТАТИ	27
A. НЕВРОПАТИЧНА БОЛКА	27
I. ПОВЕДЕНЧЕСКИ И МОРФОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА БОЛКА ПРИ МОДЕЛ НА ХРОНИЧНА КОНСТРИКТИВНА УВРЕДА НА СЕДАЛИЩНИЯ НЕРВ	27
1. Поведенчески характеристики на експерименталната болка.....	27
2. Фармакологично повлияване на невропатична болка при различни стимули	31
3. Модулация на аналгетичния ефект на СОХ-инхибиторите от бенфотиамин при модел на невропатична алодиния	37
B. НОЦИЦЕПТИВНА БОЛКА: МОДЕЛИ НА ОСТРА И ХРОНИЧНА ВЪЗПАЛИТЕЛНА ХИПЕРАЛГЕЗИЯ.....	41

<i>I. ЕФЕКТ НА АНАЛГЕТИЦИ ВЪРХУ МОДЕЛ НА ОСТРА ХИРУРГИЧНА БОЛКА</i>	41
<i>II. МОДУЛАЦИЯ НА АНАЛГЕТИЧНИЯ, ПРОТИВОВЪЗПАЛИТЕЛЕН И АНТИПИРЕТИЧЕН ЕФЕКТИ НА ИБУПРОФЕН С 18β-ГЛИЦИРИЗИНОВА КИСЕЛИНА</i>	45
1. Модулиране на аналгетичния ефект на ибупрофен от 18 β -глициризиновата киселина.....	46
2. Модулиране на антипиретичния ефект на ибупрофен от 18 β -глициризиновата киселина.....	47
3. Ефект на ибупрофен и 18 β -глициризинова киселина самостоятелно и в комбинация върху левкоцитната инфилтрация и нивата на PgE ₂ при карагенин-индуцирано възпаление	49
4. Ефект на ibuprofen плюс 18 β -glucosylrheticinic acid в сравнение със самостоятелния ефект на ibuprofen върху развитието на ревматоидно възпаление (адювантен артрит) и хипералгезия	50
ОБСЪЖДАНЕ	54
ИЗВОДИ	61
ПРИНОСИ	62
НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С	
ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	63
SUMMARY	66

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АТФ	Аденозинтрифосфат
ДИП	Десцендентни инхибиторни пътища
ЗР	Заден рог
ИЛ	Интраламинарно
КЕНИМУС	Комисия за етика на клиничните изследвания при МУ – София
НЛР	Нежелани лекарствени реакции
НСПВС	Нестероидни противовъзпалителни средства
НСТП	Неоспиноталамичен път
ПСТП	Палеоспиноталамичен път
СМП	Спиномезенцефален път
СТП	Спиноталамичен път
т.м.	Телесна маса
ЦС	Централна сензитизация
АСС	Anterior cingulate cortex
AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	Йонотропни рецептори
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
Br	Брадикинин
cAMP	Цикличен аденозинмонофосфат
CFA	Адювант на Фройнд
cGMP	Цикличен гуанозинмонофосфат
CGRP	Калцитонин ген сроден пептид
COX	Циклооксигеназа
DOPA	Дихидроксифенилаланин
Glu	Глутамат
IASP	Асоциация за изучаване на болката
IGPAR	Международни насоки и принципи за експерименти с животни
IL	Интерлевкин
IL-1 β	Интерлевкин-1 β
LC	Locus coeruleus
MAPK	Mitogen Activated Proteinkinase
mGluR	Метаботропни глутаматни рецептори
N	Брой на опитните животни в група
NA	Норадреналин
NGF	Невронален растежен фактор
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NO	Азотен оксид
NOS	Азотоксидна синтаза
nNOS	– невронална
eNOS	– ендотелна
iNOS	– индуцируема
NRM	Nucleus raphe magnus
PG	Простагландини
PGI ₂	Простаглицлин
SG	Substantia gelatinosa
sGC	Гуанилат циклаза
SGC	Централното сиво вещество
SP	Субстанция П
TH	Тирозинхидроксилазата
TNF- α	Тумор-некротизиращ фактор
TXA	Тромбоксани
VR	Ванилоидни рецептори

ВЪВЕДЕНИЕ

Болката е неприятно сензорно или емоционално усещане свързано със съществуващо или потенциално тъканно увреждане. Тя винаги е субективно изживяване и нейната крайна оценка се определя от мястото и характера на увредата, от природата на увреждащите фактори, от психичното състояние на човека, от неговия житейски опит и от други подобни фактори.

През последните години в медицинската практика се утвърди становището, че всяка болка трябва да се лекува и че неадекватното овладяване на болката е дори показател за нехуманно и неетично отношение на държавата към нейните граждани.

Персистирането на болката може да доведе до адаптивни промени от страна на определени нервни структури, което от своя страна води до хронифициране на болковия синдром.

Съществуват различни типове болка, за чието охарактеризиране се борави с различни категории, базирани на анатомични, физиологични и психологични познания. В зависимост от патогенезата, болката може да бъде ноцицептивна (соматогенна и висцерална) – възникваща вследствие активация на ноцицепторите при травма, възпаление, исхемия, разтягане и невропатична.

Сензитацията (повишената чувствителност) на ноцицептора, възниква освен при генерирането на възбуден потенциал в резултат на травма, исхемия, механично разтягане и т.н, и при отделяне в зоната на увредата на редица медиатори на възпалението – брадикинин, метаболити на арахидоновата киселина (простагландини и левкотриени), биогенни амини, пурины и др., които повишават чувствителността му към механични и термични стимули (Dray, 1997;

Julius, Basbaum, 2001). Простагландините от своя страна, вероятно и левкотриените, са относително слаби алгогени, но имат голямо значение за сензитацията на ноцицепторите към други субстанции (Besson, 1999). Сензитираните ноцицептори имат по-нисък праг на възбудимост и много по-лесно и често генерират възбудни импулси. Периферната сензитация участва в централната сензитация, която е в основата на хипералгезията и алодинията (Bhave, Gereau, 2004). Това обуславя патогенезата и проявите на острата възпалителна болка, както и нейното хронифициране.

Развитието на невропатична болка се свързва с увреда на структури в периферната и централната нервна система, участващи в провеждането на ноцицептивни сигнали (невралгии, фантомна болка, таламична болка). Невропатичната болка е мъчителна като изживяване по своя характер и трудно подаваща се на лечение. Симптомите включват загуба на осезание, бодежи/изтръпване, изгаряща остра, пронизваща, прищракваща болка; налице винаги е алодиния и хипералгезия. Причини за настъпването на периферна невропатия са травматичното увреждане на нервни влакна или тяхната компресия, вирусни инфекции (херпес зостер), метаболитни промени (диабетна невропатия), токсини, неоплазми и т.н. Механизмите включени в невропатичната болка са комплексни и включват периферни и централни компоненти.

От особен интерес за нас е изследването на хирургичната болка, както в нейния ноцицептивен, така и в нейния невропатичен аспект, а също така и практическото повлияване на тези компоненти от клинично значимите аналгетици, както и възможностите за ефикасно приложение на преемптивна аналгезия.

Известно е, че понастоящем не съществува единен терапевтичен подход за контрол на всички видове болка и при всички пациенти.

Контролът на болката се свързва с комплекс от методи – фармакологични, хирургични, рехабилитационни, както и необходимост от обучение и информираност на пациента. Адекватно фармакологично лечение на болката може да се очаква при комплексен подход (механизъм насочено лечение, комбинирана терапия) и максимално индивидуализиране, отчитащо стадия на болестта, емоционално състояние на страдащия, пола и генетични особености.

Повечето групи аналгетици имат свойството да потискат неврохимични механизми и анатомо-физиологични пътища за провеждане на ноцицептивните стимули, осъзнавани като комплексно изживяване на болка и дори страдание, и да активират ядра и невротрансмитери, отговорни за потискане на болковите усещания, и свързани с усещането за удоволствие.

Когато е налице тежка болкова симптоматика, продължителното прилагане на опиоиди не води до развитие на психическа зависимост, но трябва да се търсят адювантни средства за забавяне на развитието на толерантност, за отслабване на симптомите на физическа зависимост, а при НСПВС – за намаляване на други НЛР. От изключително значение за постигане на оптимален аналгетичен ефект е определянето на водещия тип на болката по механизъм – ноцицептивен или невропатичен, възпалителна хипералгезия и т.н. В много случаи болката има смесен характер, което обуславя необходимостта от комбиниране на различни по механизъм на действие агенти с цел постигане на максимално обезболяване при минимални НЛР.

Нестероидните противовъзпалителни средства (НСПВС) са традиционни и най-често използвани медикаменти при умерена и силна хронична болка последвани от опиоиди, парацетамол, COX2

инхибитори и др. НСПВС (наричани често и ненаркотични аналгетици). Те повлияват предимно ноцицептивната болка, притежават антиинфламаторен и антипиретичен ефект.

Обединяващо във фармакодинамиката на тези средства и обуславящо техните ефекти (както терапевтични така и нежелани) е инхибирането на ензима циклооксигеназа (COX). Селективните COX₂ инхибитори бяха създадени за да ограничат нежеланите реакции на НСПВС като се запази изразената противовъзпалителна активност, но в последните години особено внимание се обръща на риска от сърдечно-съдови усложнения при лечението с НСПВС, с оглед на зачестилите случаи на сърдечно-съдови нежелани реакции в резултат на приема им.

Тази година приключва и първото SOS-проучване по искане на Европейската агенция за лекарства относно наблюдаваните много сериозни рискове от инсулти и сърдечни инциденти от кетопрофен. Известни са и останалите рискове по отношение на сърдечносъдова и периферносъдова недостатъчност, както и на улцерогенни ефекти.

* * *

От изложените данни се вижда, че широкоизползваните НСПВС и опиоидни аналгетици, имат сериозни нежелани лекарствени реакции, поради което една от основните задачи в настоящия труд е търсене и на адюванти на НСПВС и опиоидните аналгетици, които да доведат до засилване на желаните ефекти и до намаляване на риска от нежелани реакции.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Целта на настоящия труд е валидиране на експериментални модели, отразяващи различни патогенетични механизми на болката и търсене на адювантни средства за подобряване на аналгетичния ефект на клинично значими аналгетици.

ЗАДАЧИ

1. Изследване на действието на съвременни аналгетици и бенфотиамин като възможен адювант при неопиоидна аналгетична монотерапия при модел на невропатична болка.

1.1. Разработване и валидиране на експериментален модел на невропатична болка чрез констрикция на n. ishiadicus и изследване на промените в различни еквиваленти на симптоми при човек със съвременни експериментални тестове.

1.2. Изследване на аналгетичния ефект на COX-инхибитори, метамизол и опиоиди върху различните прояви на невропатична болка със съвременни експериментални тестове.

1.3. Изследване на модулиращия ефект на бенфотиамина върху антиалодиничното действие на COX-инхибитори при невропатична алодиния.

2. Експериментални проучвания на неопиоидни аналгетици при остра постоперативна болка.

2.1. Разработване и валидиране на експериментален модел на постоперативна болка и изследване на аналгетичния ефект на ненаркотичния аналгетик метамизол и селективния COX₂ инхибитор

парекоксиб, прилагани самостоятелно. Проследяване на възможностите за „преемптивна” аналгезия при предоперативно прилагане на метамизол.

3. Изследване на действието на COX-инхибитори и 18 β -глициризинова киселина като възможен адювант на противовъзпалителното, аналгетично и антипиретично действия на НСПВС.

3.1. Валидиране на експериментален модел на адювантен артрит на Фройнд и карагениново възпаление/хипералгезия и изследване на модулацията на аналгетичния, противовъзпалителния и антипиретичния ефекти на ибупрофен от 18 β -глициризинова киселина.

3.2. Валидиране на експериментален модел на остро възпаление с отчитане на инвазията с полиморфонуклеарни клетки и изследване на модулиращия ефект на 18 β -глициризиновата киселина и ибупрофен върху левкоцитната миграция и простагландиновата биосинтеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

I. IN VIVO ЕКСПЕРИМЕНТИ

Експериментите *in vivo* бяха проведени върху *инбредни мъжки бели плъхове линия Wistar* с т.м. 180–200 g. В зависимост от провежданите експерименти животните бяха разпределяни в групи от 6 до 12. Те са доставяни от централен вивариум, при спазване на стандартни условия за отглеждане, храна и вода *ad libitum*. Спазвани бяха Международните насоки и принципи за експерименти с животни (IGPAR). Дизайнът на експериментите бе съгласно процедура, одобрена от КЕНИМУС.

Преди и по време на третиране бяха измервани ноцицептивните прагове на всяко животно.

Използвани бяха различни модалности на ноцицептивен стимул:

A. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ

1. Модел на невропатична болка

Хронична констриктивна увреда на п. ichiadicus (CCI). Хроничната констриктивна увреда на седалищния нерв се предизвиква чрез хлабава двойна лигатура на нерва на десния крак на животното. Операцията се извършва под пълна анестезия (нембутал 12 mg/kg и кетамин 50 mg/kg i.p.). Постоперативно еднократно се прилага гентамицин (8 mg/kg).

Развитието на невропатия бе проследявано във времето и промяната на прага на болката, определяна на 15, 20, 30, 35 и 40-ия ден от лигирането на нерва. Тактилната алодиния бе определяна чрез автоматичен електронен von Frey динамичен плантарен естезиометър (Ugo Basile, Italy; von Frey тест). Механичната хипералгезия беше

определена чрез натиск (Paw pressure test, PPT), а термалната хипералгезия чрез Hot plate test (HP) и Heat plantar test (HPT, Hargreaves test). Нарушената функция на задните лапки беше оценена чрез инкапацитанс тест.

Фармакологично третиране: Metamizole (*Analgin*) 150 mg/kg i.p., Parecoxib (*Dynastat*) 5 mg/kg, i.p., Ibuprofen 20 и 40 mg/kg, Morphine 5 mg/kg, s.c., Tramadol 30 mg/kg, p.o., Amitriptyline 10 mg/kg i.p. Аналгетичният ефект бе определян 1 h след прилагане на изследваните вещества.

2. Модели на ноцицептивна болка

2.1. Остра хирургична болка

Като модел на остра постоперативна болка бе извършвана плантарна инцизия. Под етерна наркоза се прави 1 cm надлъжен разрез на кожата и фасцията на плантарната страна на дясната задна лапа, започващ на 0,5 cm от проксималната част на петата в посока към пръстите. Плантарният мускул се повдига и се инцизира надлъжно, като началната и залавна точка на мускула остават интактни. След хемостаза кожният разрез бе зашиван. Локално бе поставян немибадин и животните се оставят в самостоятелни кафези.

Оперираниите плъхове бяха третирани с Metamizole (*Analgin*) 150 mg/kg i.p., Parecoxib (*Dynastat*) 5 mg/kg, i.p., Ibuprofen 20 и 40 mg/kg, самостоятелно. Аналгетичният ефект бе определян на 1, 2, 24-ия час след операцията, на 4 и 7-ия постоперативен ден.

В група експерименти 30 min преди операцията бе прилаган Metamizole (150 mg/kg i.p), а веднага след нея с някои от изброените аналгетици.

Тактилната алодиния бе определяна чрез автоматичен електронен von Frey динамичен плантарен естезиометър (Ugo Basile,

Italy). Механичната хипералгезия беше определена чрез натиск (PPT; Ugo Basile, Italy). Нарушената функция на задните лапки беше оценена чрез инкапацитанс тест.

За определяне на болковата чувствителност при отделните опитни постановки бяха измервани базални стойности преди операция, на 1-ия и 2-ия след инцизията и на 1-ия и 4-ия постоперативни дни.

2.2. Остра карагенинова възпалителна хипералгезия

Хипералгезия се предизвиква чрез интраплантарно въвеждане на 0,1 ml 1% разтвор на карагенин (Sigma) в едната задна лапа. Болковата чувствителност се определяше на 3-ия час на простагландиновата хипералгезия. Промяната в ноцицепцията се отчиташе по метода на Randall-Selitto (1957) с аналгезиметър на Ugo-Basile (Paw Pressure Test), а антиексудативният ефект (промяната в обема на лапките) – плетизмометрично с плетизмометър на Ugo-Basile – 30, 60, 90, 180 и 240 min след въвеждането на веществата.

Аналгетичният ефект се изразяваше в относителни единици – g/cm^2 издържано натоварване върху лапата на плъх (Ruprent et al., 1990). Антиексудативният ефект се изчисляваше като процент на инхибиция по формула на Тринус и Мохарт (1975) или като разлика на обемите болна/здрава лапа, изразена в релативни единици (RU).

2.3. Хронична възпалителна хипералгезия при адювантен артрит на Фройнд

Артритът се предизвиква с пълен адювант на Фройнд – CFA (маслена суспензия на убити туберкулозни бактерии, НЦЗПБ). Субплантарното инжектиране на плъховете с 0.1 ml/лапа от адюванта на Фройнд води до развитие на автоимунно възпаление, което по параклинични и патоморфологични промени наподобява

ревматоидния артрит при човек. Реакцията протича в две фази: остра – в първите 3–5 дни и хронифициране на процеса след 7-ия ден, при което от възпалителния процес се обхващат и другите стави. Важна характеристика на този модел е тежката хипералгезия.

Ефектът на изследваните фармакологични агенти бе оценяван по метода на Randall-Selitto с оригинален апарат на фирмата Ugo Basille (Paw Pressure Test), който се изразява в отдръпване на болното ходило след натоварване с определена тежест.

Промените в болковия праг бяха измервани на 30, 60, 120 и 240-ата минута след инжектиране на изследваните модулатори на болката. Опитите са извършвани в периода на остра възпалителна болка и в периода на хронифициране – на 8–10-ия ден.

3. Модел на хипертермична реакция

Фебрилната реакция се предизвикваше с инжектиране на 20% суспенсия от бирена мая в доза от 1 ml/100 g т.м., инжектирана подкожно 1 h преди прилагане на ибупрофен 10, 20 или 40 mg/kg, 18 β -глицеризинова киселина 10 mg/kg и комбинация.

Определяна бе базалната телесната температура на плъховете, фоновата телесна температура (преди въвеждане на изследваните вещества), както и на 3, 4, 5, 5.30, 6 и 7-ия час от инжектирането на бирена мая, чрез ректален термистор, свързан с многофункционално регистриращо устройство (Ugo Basile).

Б. ТЕСТОВЕ ЗА ОТЧИТАНЕ НА НОЦИЦЕПТИВНИ/АЛОДИНИЧНИ ПРОЯВИ

1. INCARCITANCE TEST

Апаратът, с който се провежда Incarcitance тестът, позволява да се отчете разпределянето на тежестта на тялото върху задните крайници. Отчитат се две стойности, показващи колко от т.м. (в грамове) е пренесено върху всеки един от крайниците (фиг. 1).



Фиг. 1. *Incapacitance test*. Животното е поставено така, че да пренася цялата тежест на тялото върху задните крайници. Разпределението на тежестта корелира със силата на болката, която изпитва.

Голямото предимство на този тест е това, че в момента на измерването животното е оставено напълно самостоятелно, като се дава възможност да се проследи степента на нарушаване на функцията на засегнатия крайник, независимо от патогенетичния механизъм на болката. Напълно се избягва и влиянието на експериментатора. По това до каква степен животното щаци възпалената си лапа, можем да съдим за силата на болката, която изпитва. Тъй като при всяко измерване се отчитат едновременно по две стойности, въведохме метод за унифицирано представяне на данните чрез изчисляване на съотношението възпалена/здрава лапа. Така получените данни са много по-лесно достъпни за обработка, графично представяне и интерпретация.

2. PAW PRESSURE TEST

Принципът на действие на аналгезиметъра е упражняване на натиск върху лапата на плъха с помощта на лост, по който с постоянна скорост (40 mm/s) се приплъзва тежест (74 g). Лостът е снабден с пластмасов конус, който се поставя върху лапата, като площта на конуса при върха е 1.4 mm². Животното свободно може да отдръпне лапата си в момента, в който силата на стимула надвиши прага на болковата му чувствителност. Натискът се отчита по линейна скала в относителни единици (Relative Units, RU).

Тестът се осъществява с аналгезиметър на Ugo Basille. Прилага се натиск върху задната лапа на плъх, която е поставена под „острието“ на аналгезиметъра с постепенно увеличаващ се натиск (до 500 g). Степента на аналгезия се отчита по специфична двигателна реакция на животното, която се състои в отдръпване на лапата при достигане на болковия праг. Отчитат се относителни единици съгласно скалата на апарата (фиг. 2).



Фиг. 2. Paw pressure test: Отчита се силата на натиска, при която животното отдръпва лапата си.

3. TAIL-FLICK TEST

Тестът се провежда с аналгезиметър (Ugo Basile, Italy), осигуряващ стандартизиран източник на топлина, свързан с автоматичен таймер, отчитащ времето (в секунди) за отдръпване на опашката на плъха при топлинното дразнене (фиг. 3). Силата на топлинния стимул се стандартизира 5–8 sec при контролните животни. Групите се подбираха след „фонови” измервания на нетретираните животни с близки латентни времена. При стойности над 20–25 sec отчитането се преустановяваше, за да се избегнат топлинни увреждания.

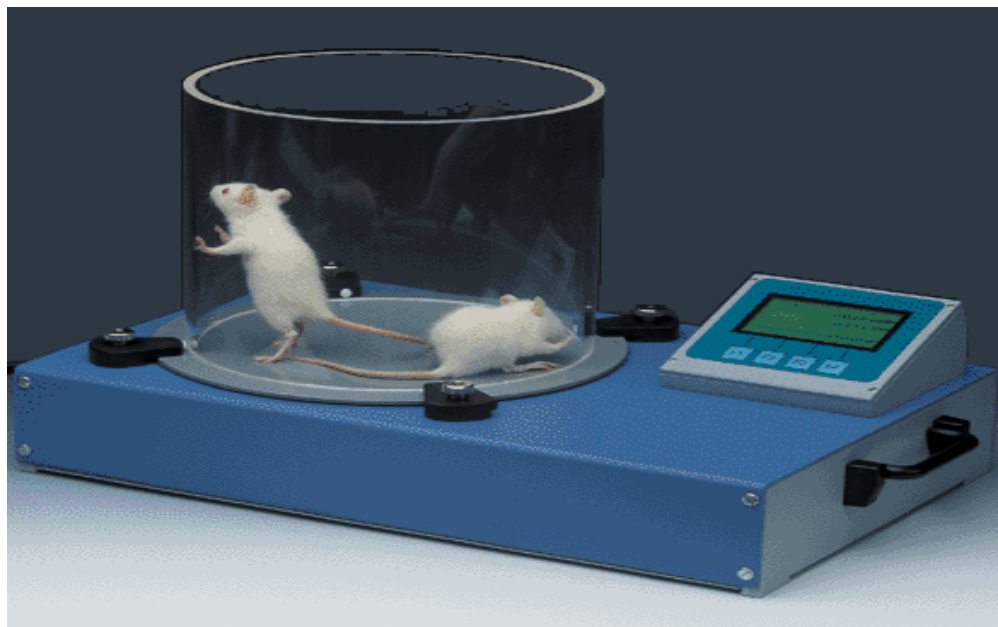


Фиг. 3. Tail flick test. Термалният лъч е фокусиран върху дисталния край на опашката, като времето, за което животното я отдръпва, се отчита с таймер.

4. HOT PLATE TEST

Тестът бе извършван с гореща плоча за плъхове (Ugo Basile) (фиг. 4), при температура на плочата 51°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), отчитано бе времето (sec), за което плъхът облизва задните си лапи (латентно време). След изтичане на 60 sec при третирани животни измерването се преустановяваше с цел да бъдат избегнати топлинни увреждания на лапките на животните; при фононите измервания това време (cut off) е 30 sec.

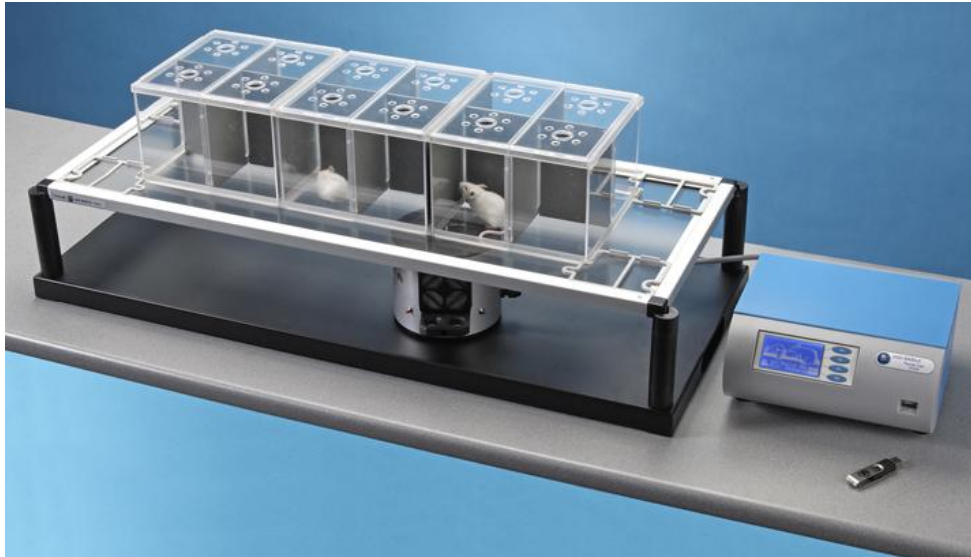
Ноцицептивните прагове, определени с Tail-Flick и Hot Plate, бяха верифицирани като латенции (в секунди) от началния момент на прилагане на ноцицептивния стимул, до момента на реакция на животното, показваща началото на болковото усещане. Резултатите от TF и HP бяха изчислени като максималния възможен ефект.



Фиг. 4. Hot plate test. При този тест се отчита времето, за което животното близва задната си лапа.

5. PLANTAR HEAT TEST

Този тест се осъществява с апарат на Ugo Basile (Italy) (фиг. 5) по оригиналния метод на Hargreaves et al. (1988), като се прилага подвижен източник на инфрачервена светлина, насочен перпендикулярно към средната трета на съответната лапа на плъха. Предварително животните са поставени в прозрачен плексигласов съд, който е повдигнат над работната маса, и са оставени да се аклиматизират за около 20 min. Подвижният източник притежава датчик, който отчита отразената от лапата светлина. След като опитното животно почувства болка, то отрпва лапата си, при което датчикът спира да възприема отразената светлина и апаратът регистрира съответното латентно време в секунди.



Фиг. 5. *Plantar heat test*. Когато опитното животно почувства болка, отдръпва лапата си, датчикът спира да възприема отразената светлина и апаратът регистрира съответното латентно време в секунди.

6. VON FRAY TEST

Механичната алодиния бе измервана и с динамичния плантарен естезиометър (тест на Фон Фрей), произведен от (Ugo Basile – Italy) (фиг. 6). При него се използва ригидна метална нишка, която се издига перпендикулярно към средната трета на съответната задна лапа на плъха. Задават се стойности на натиск върху лапата от 0 до 50 g и време за реализиране на натиска – от 0 до 20 sec.



Фиг. 6. Динамичен плантарен естезиометър (*Von Fray test*)

7. PLETHYSMOMETRY

Плетизмометърът представлява два цилиндъра, свързани по принципа на скачените съдове, единият от които е снабден с електроди (фиг. 7). Когато съдовете са пълни с течност (електролит), потапянето на лапата променя нивото на течността и това води до изменение в провеждането между двата електрода. Регистрираните промени във водоизместването се отчитат върху електронен дисплей. Всички апарати, с които се провеждаха *in vivo* експериментите, са от Ugo Basile, Italy.



Фиг. 7. Plethysmometer. Обемът на лапата (в ml) се отчита на базата на водоизместимостта.

II. EX VIVO/IN VITRO МЕТОДИ

1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЛЕВКОЦИТНАТА ИНФИЛТРАЦИЯ И НИВАТА НА PgE₂ ПРИ КАРАГЕНИН ИНДУЦИРАНО ВЪЗПАЛЕНИЕ

Този метод предоставя информация за ефектите на противовъзпалителните средства върху инвазията на левкоцити и простагландини във възпалителното огнище.

Полиестерни гъби с размери 3,5/2,5/0,8 см, напоени с 2% карагенин се имплантират подкожно в абдоминалната област на животните под нембуталова анестезия. Плъховете се жертват на 24-ия час и възпалителния ексудат се отделя от полиестерните гъби.

Броят на полиморфонуклеарните левкоцити в см³ се определя с помощта на камера на Neubauer и фазово контрастна микроскопия.

Простагландините се извличат с хлороформ-етанол по метода описан от Higgs и Vane. Сухият остатък от кисели липиди се разтваря във физиологичен разтвор за радиоимунологично определяне. Радиоимунологичните изследвания са осъществени по метода описан от Jobke et al. (1973).

2. ХИСТОМОРФОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ КОНСТРИКТИВНАТА УВРЕДА НА СЕДАЛИЩНИЯ НЕРВ

За морфологичните проучвания в края на изследвания период са използвани две животни от група СС1.

След предварително анестезиране с тиопентал (40 mg/kg телесно тегло, интраперитонеално) плъховете се фиксират чрез перфузия с разтвор на Karnovsky – 2% параформалдехид и 2.5% глутаралдехид в 0.1 М фосфатен буфер с рН 7.4 за 20 минути. Взети са тъканни парченца от следните места на всяко перфузирано животно: nervus ischiadicus на около 5 мм над мястото на лигатурата, nervus ischiadicus

на около 5 мм под мястото на лигатурата, *nervus suralis* от оперирания крайник и *nervus suralis* от другия, неопериран крайник.

Докато трае тази процедура, късчетата престояват във фиксиращия разтвор на 20°C. Те се изплакват после във фосфатен буфер и постфиксираат в 1% разтвор на осмиев четириокис в буфера за 1–2 часа на 4°C. Впоследствие грижливо се изплакват във фосфатния буфер и дехидратират във възходяща серия от разтвори на етилов алкохол. Пропиленоксидът се използва като преходна течност преди тъканните блокчета да бъдат включени в Durcupan (Fluka). Пригответените ултратънки срезове двойно се контрастират с оловен цитрат и уранил ацетат и се наблюдават с трансмисионен електронен микроскоп Hitachi H-500 при напрежение 75 киловолта.

СТАТИСТИЧЕСКА ОБРАБОТКА

Статистическата обработка на резултатите е извършена чрез компютърна програма InStat, като са използвани one-way ANOVA, последван от Bonferroni и Dunnett тестове. Статистическата значимост е дефинирана при $p < 0,05$, резултатите са представени като средна стойност със стандартно отклонение (\pm SEM).

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РЕЗУЛТАТИ

А. НЕВРОПАТИЧНА БОЛКА

I. ПОВЕДЕНЧЕСКИ И МОРФОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА БОЛКА ПРИ МОДЕЛ НА ХРОНИЧНА КОНСТРИКТИВНА УВРЕДА НА СЕДАЛИЩНИЯ НЕРВ

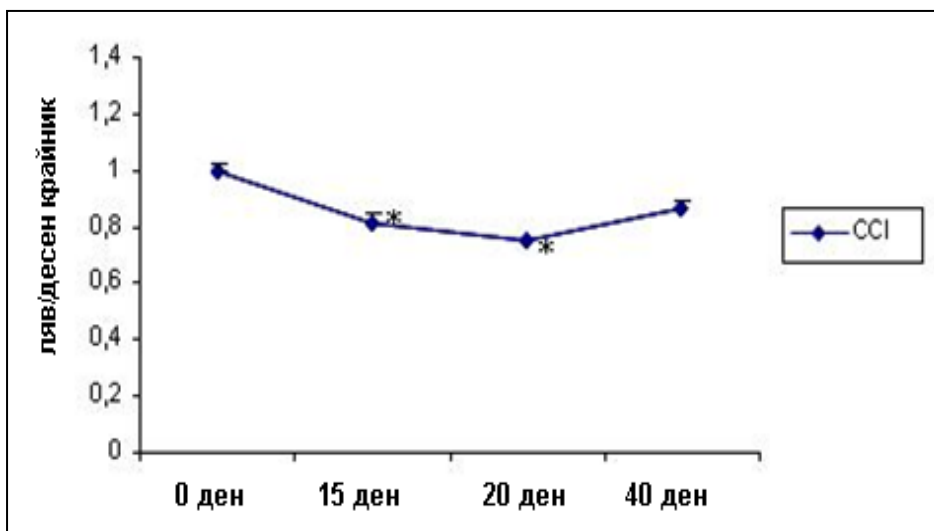
1. Поведенчески характеристики на експерименталната болка

1.1. Роля на различни стимули за болка (алодиния) за отчитане на прояви на еквиваленти на невропатичната болка при човек

Констриктивната увреда на n. ishiadicus (CCI) е един от широко използваните експериментални модели на невропатична болка. Клиничните характеристики на невропатичната болка се различават от ноцицептивната болка значително в зависимост от приложения стимул за предизвикване на болката.

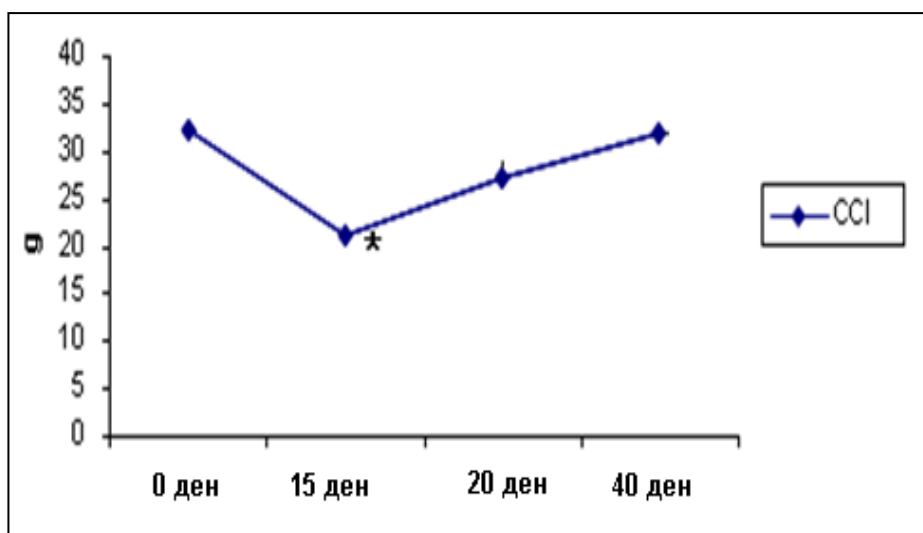
В тази серия експерименти са представени основните резултати за поведенческата изява на невропатична болка при CCI в зависимост от прилаганите различни (специфични) стимули, които дават възможност за проследяване впоследствие на фармакологичните ефекти на различни групи лекарствени продукти.

Инкапацитанс тест. При проследяване на динамиката на невропатична болка с метода на инкапацитанс теста бе установено, че максимално щадене на болния крайник се наблюдава между 15-ия и 20-ия ден (фиг. 8).



Фиг.8. Промени в развитието на невропатична болка (CCI) при инкапацитанс тест; * $p < 0.05$ спрямо здравите животни (0 ден) ($n=6-8$)

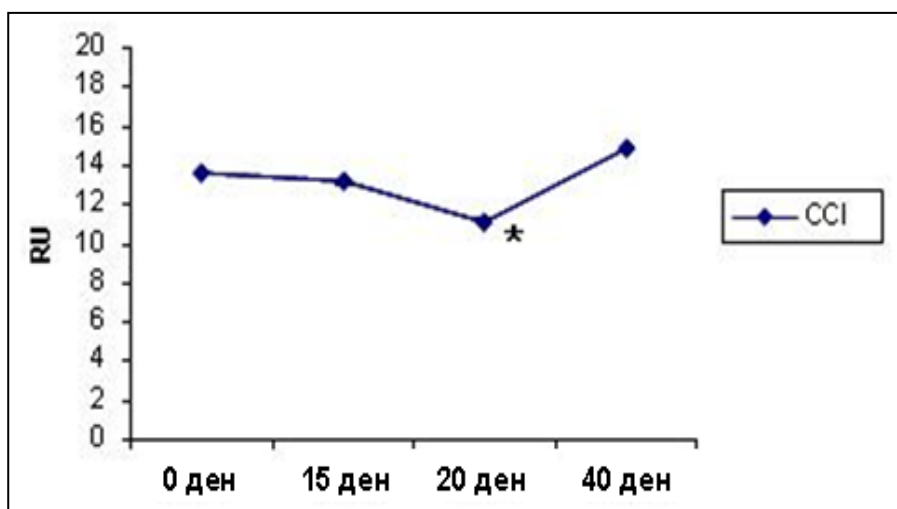
Von Frey тест. Аналогично развитие във времето се наблюдава и при развитието на тактилна алодиния (*von Frey тест*) (фиг. 9). При този тест невропатичната болка достига максимум между 12-ия и 17-ия ден след констрикцията на нерва и постепенно се наблюдава намаляване на алодинията.



Фиг. 9. Промени в развитието на невропатична болка (CCI) при тест на тактилна алодиния; * $p < 0.05$ спрямо здравите животни (0 ден) ($n=10-12$)

Raw pressure и Hot plate/Plantar Heat тест. При използването на тестовете за определяне на механична и термична хипералгезия

максимумът на хипералгезията бе установен също между 17-ия и 22-рия ден (фиг. 10).



Фиг. 10. Промени в развитието на невропатична болка при тест за натиск върху лапата; * $p < 0.05$ спрямо здравите животни (0 ден) ($n=8-10$)

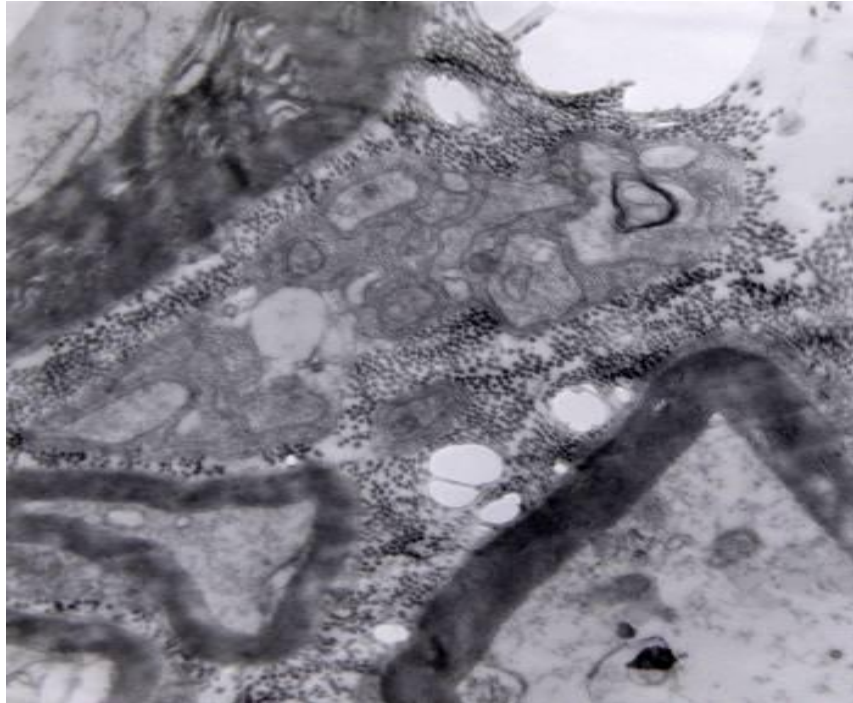
Проследявайки развитието на основните характеристики на невропатичния болков синдром (алодиния и хипералгезия), при CCI може да се заключи, че е налице изразена тактилна алодиния и в различна степен механична и термична хипералгезия в зависимост от прилаганите стимули.

Въз основа на получените резултати всички фармакологични експерименти са провеждани между 12-ия и 22-рия ден в зависимост от използване от алогенен стимул.

1.2. Хистоморфологични характеристики на нервната увреда при CCI

N. ischiadicus под лигатурата. Повечето миелинизирани профили показват неувреден миелин. В тези случаи аксоплазмата е с обичаен изглед, или понякога локално отделена от миелиновата обвивка, и може да съдържа отделни вакуоли. Срещат се и случаи с локална деструкция на миелина и електронно уплътнена аксоплазма, съдържаща множество вакуолизирани профили (фиг. 11). Амиелинизираните влакна може да са в почти неувредени снопчета. Често се срещат обаче снопчета от амиелинизирани профили с

нарушена структура – аксоплазма с повишена електронна плътност и вакуолизирани профили.



Фиг. 11. Трансмисионна електронна микроскопия на срез от n. ischiadicus при констрикция на нерва (20-ти ден); 5 мм под лигатурата (x 19000)

N. ischiadicus над лигатурата. При изследване над мястото на лигатурата се установява нормална структура на нерва. Установяват се и единични промени в някои амиелинизирани профили – раздуване и леки промени в обичайните овални контури.

N. suralis. Използвано беше теоретичното обстоятелство, че този нерв съдържа 100% сетивни влакна и се отделя под мястото на наложените лигатури. Така че промените в него със сигурност ги категоризират като промени на сетивните нервни влакна. Съществува корелация с установените и по-горе вече описани промени под нивата на лигиране в n. ischiadicus – същите изменения бяха намерени и при изследване на n. suralis.

2. Фармакологично повлияване на невропатична болка при различни стимули

2.1. Фармакологични ефекти на ибупрофен и парекоксиб

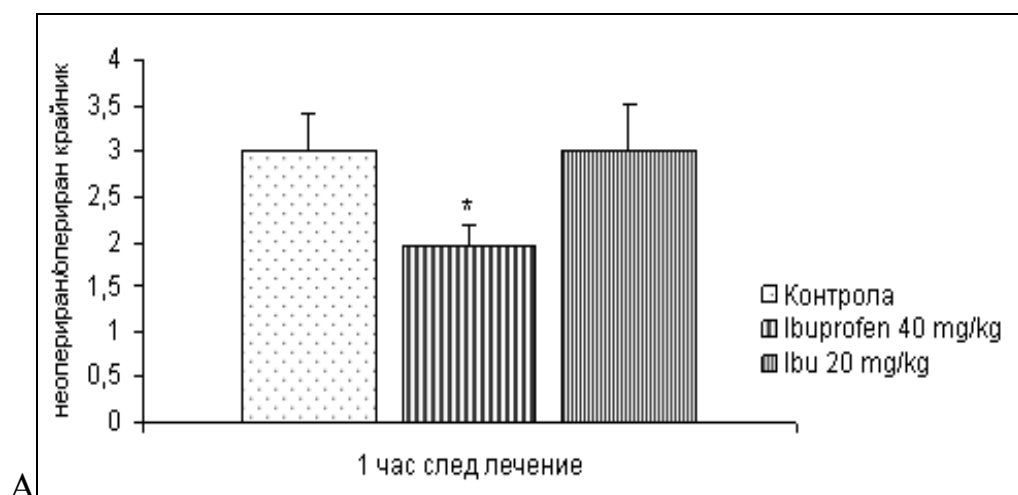
Схема на третиране

Изследвани бяха аналгетичните ефекти на ибупрофен в доза 20 и 40 mg и парекоксиб в доза 5 mg/kg върху модели на невропатична болка (CCI) с Incapacitance test, Von Fray и термична хипералгезия.

Резултати

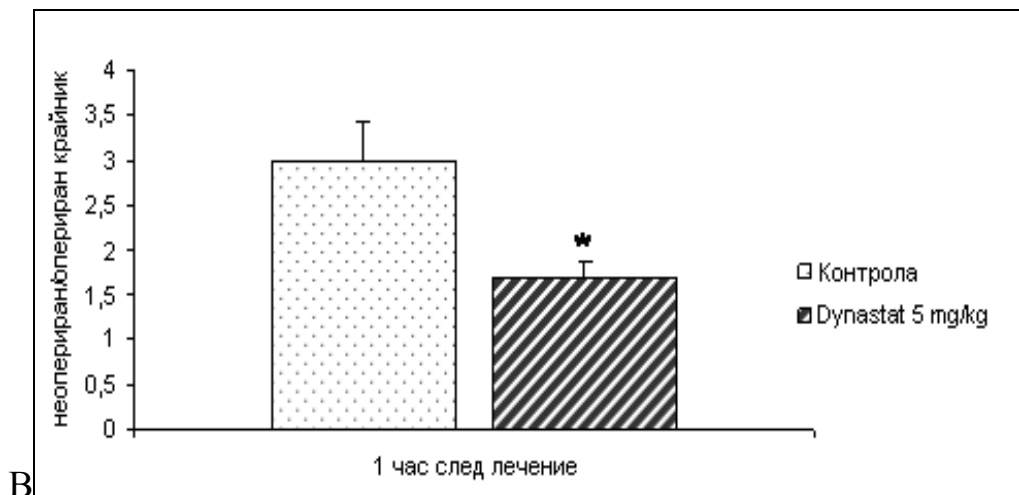
Установено бе, че плъховете със CCI невропатична болка показват типични поведенчески симптоми на спонтанна болка (щадене на крайника, избягване да използват увредения крайник и средно изразена аутономия).

Промените в отношението на разпределението на т.м. с Incapacitance test се наблюдаваха повече от 20 дни. Третирането с ибупрофен 20 mg/kg не показва аналгетичен ефект при този модел. Повишаването на дозата на ибупрофена на 40 mg/kg доведе до сигнификантно потискане на болката ($p < 0.05$) (фиг. 12-А).



Фиг. 12-А. Ефект на ибупрофен на разпределението на тежестта (Incapacitance test); * $p < 0.05$ спрямо контрола (n=6–8)

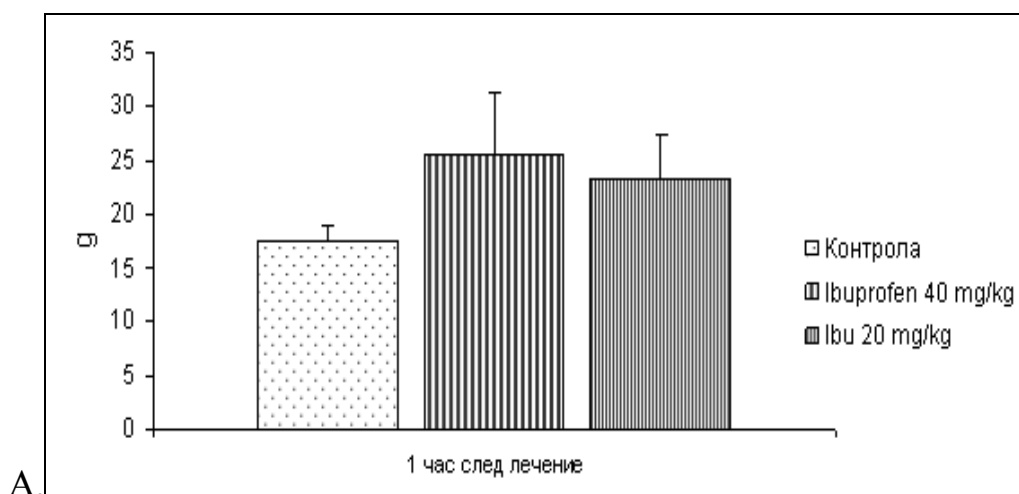
Парекоксиб в доза 5 mg/kg значимо облекчава болката и спонтанното поведение на животните (фиг. 12-В).



Фиг. 12-В. Ефект на парекоксиб на разпределението на тежестта (Incaracitance test); * $p < 0.05$ спрямо контрола (n=6–8)

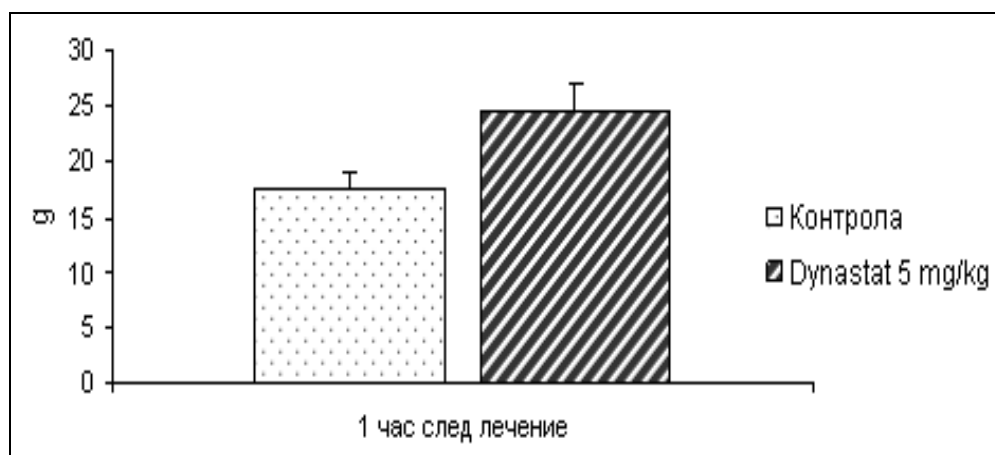
2.2. Ефект на ибупрофен и парекоксиб върху механична алодиния (тест на Von Fray)

Установено бе, че ибупрофен в дози 20 и 40 mg/kg и парекоксиб в доза 5 mg/kg не проявяват антиалодинично действие при тест на Von Fray (фиг. 13-А, В).



Фиг. 13-А. Ефект на ибупрофен при механична алодиния, Von Fray праг на отдръпване (g) (n=8–10)

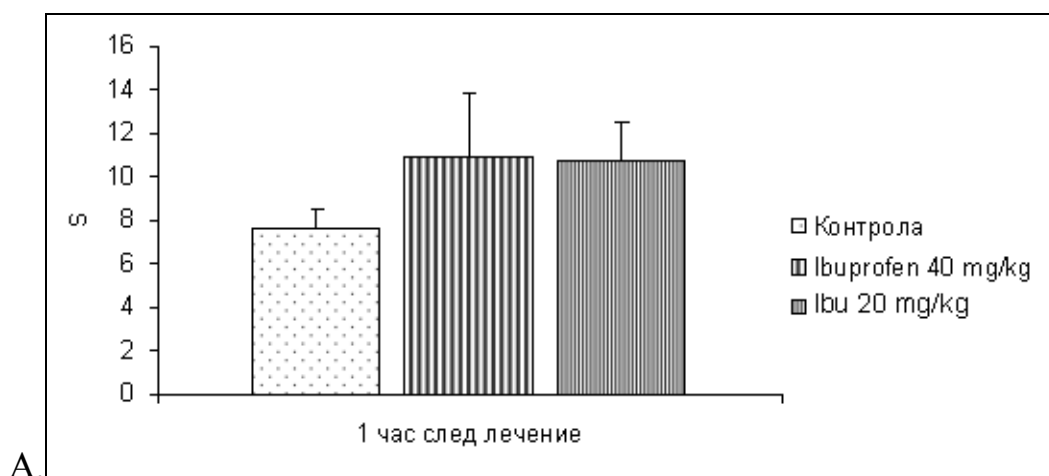
Тези данни отново потвърждават, че различните прояви на невропатична болка се повлияват в различна степен от широкоизползвани в клиничната практика аналгетици. Изявата на крайните ефекти в значителна степен се обуславя и от диагностичните тестове, отразяващи различни патогенетични механизми.



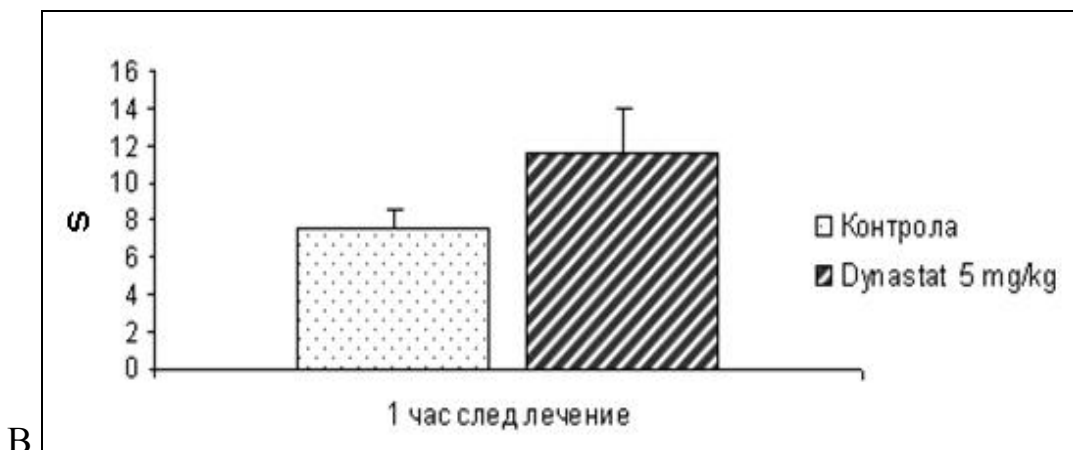
В. **Фиг. 13-В.** Ефект на парекоксиб при механична алодиния, Von Frey праг на отдръпване (g) (n=6–8)

2.3. Термична хиперсензитивност (*Plantar heat test*)

Установено бе, че термичната хиперсензитивност се увеличава от 14.5 ± 2 sec (при неоперираните плъхове) до 7.9 ± 0.9 sec след констрикция на n. Ischiadicus. Установена бе тенденция за повишаване на прага на болка от COX-инхибиторите, което обаче не достига статистическа сигнификантност (фиг. 14-А, В).



А.



Фиг. 14. Ефект на ибупрофен (А) и парекоксиб (В) при термална хипералгезия, праг на отдръпване при топлина (секунди) (n=8–12)

2.2. Фармакологични ефекти на метамизол и морфин

Метамизолът е неопиоиден аналгетик с изразен ефект при ноцицептивна болка, който засилва освобождаването на бета-ендорфин (Власковска и колектив, 1989).

Схема на третиране

Използвани бяха следните групи експериментални животни с невропатична болка ССІ:

1. Контролна група с невропатична болка, третирана с физиологичен разтвор.
2. Група с невропатична болка, третирана с метамизол 150 mg/kg i.p.
3. Група с невропатична болка, третирана и морфин 5 mg/kg подкожно.

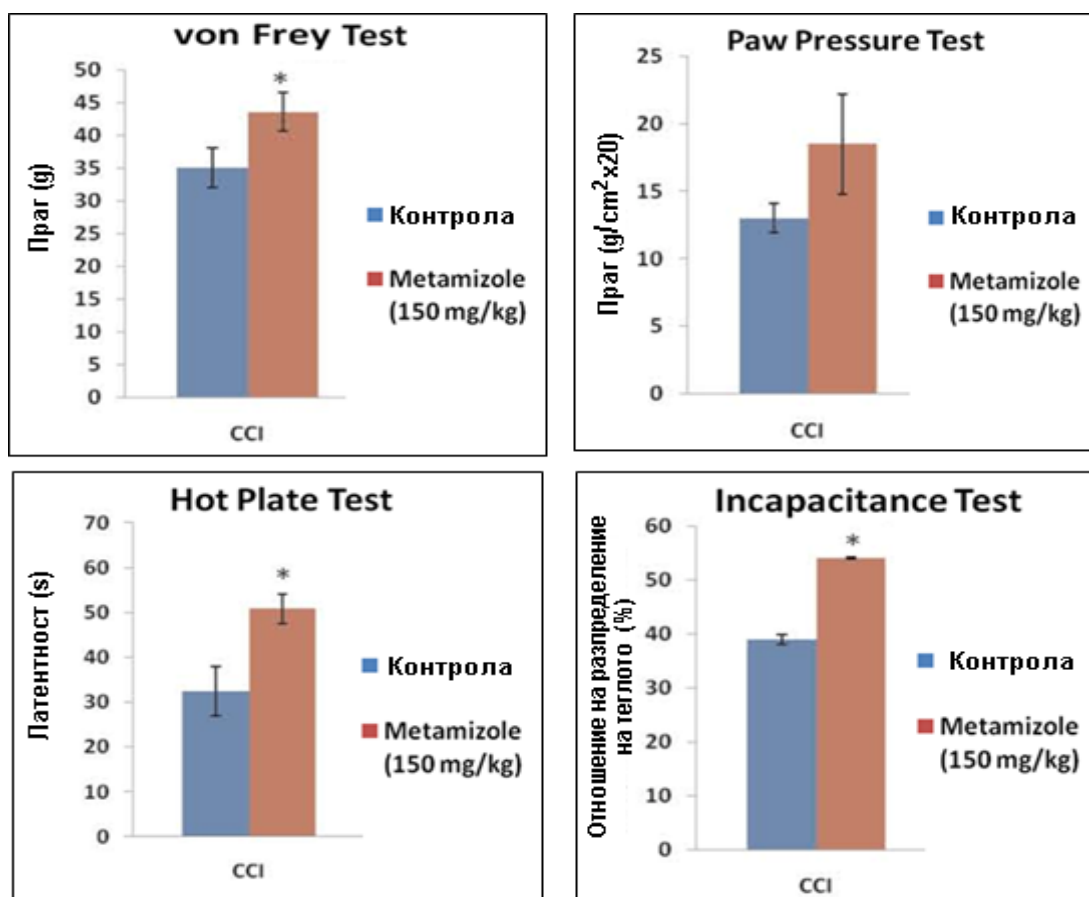
Изследването за аналгетичен ефект при различните тестове се извършваше 60 min след инжектиране на аналгетика.

Резултати

Както се вижда от фиг. 15, метамизол в доза 150 mg/kg повишава болковия праг при Hot Plate тест с 38%, при инкапацитанс тест – с 30%.

Значим аналгетичен ефект практически не се наблюдава при Paw Pressure тест, където повишението на прага на дразнене е между 21 и 25%.

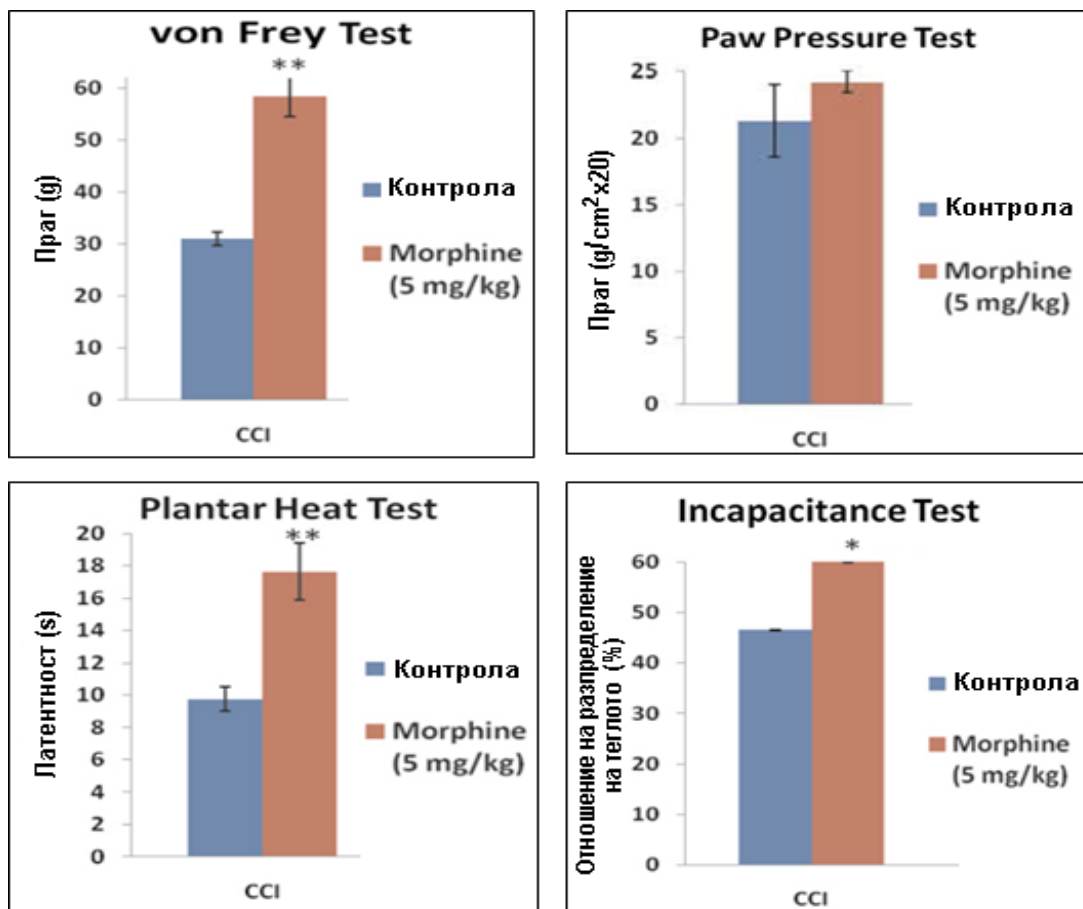
Получените резултати потвърждават, че ефектът на метамизол, както и на други аналгетици, в значителна степен се определя от стимулите, предизвикващи алодиния/болка.



Фиг. 15. Ефект на метамизол върху алодинията при невропатична болка (CCI) при различни стимули; * $p < 0.05$ спрямо нетретираните животни ($n=6-8$)

Морфинът в доза 5 mg/kg прояви по-силно изразен аналгетичен ефект в сравнение с метамизола при тест von Frey и Plantar Heat тест.

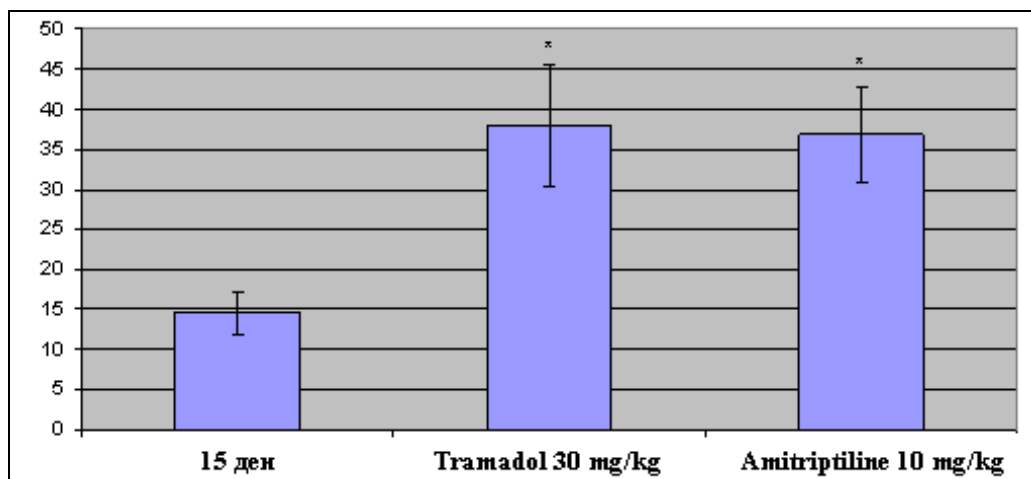
Както се вижда от фиг. 16, морфинът проявява силно изразено аналгетично действие при von Frey и при Plantar Heat тест в сравнение с инкапацитанс тест, като повишава болковия праг с 48% при von Frey и с 45% при Plantar Heat тест. Спонтанната проява на болка (инкапацитанс тест) също се повлиява от приложениия морфин (фиг. 16).



Фиг. 16. Ефект на морфин върху алодинията при невропатична болка (CCI) при различни стимули; * $p < 0.05$ спрямо нетретираниите животни ($n=6-8$)

Подобни ефекти бяха установени при прилагане на трамадол в доза 30 mg/kg и amitriptylin – 10 mg/kg. Установено бе, че на 15-ия ден от развитие на невропатичната болка препаратът трамадол повишава болковия праг при Hot Plate теста с 58%. Подобен ефект по сила бе установен и при amitriptylin 10 mg/kg, който също повишава с над 56% болковия праг при теста на Hot Plate (фиг. 17).

Интересно е, че при теста за натиск върху лапата трамадол прояви своя аналгетичен ефект (повишаване болковия праг с 38%), докато amitriptylin няма антиалодиничен/аналгетичен ефект.



Фиг. 17. Аналгетичен ефект на трамадол и амитриптилин при Hot Plate тест; * $p < 0.05$ спрямо нетретирани (15-ти ден) ($n=6-8$)

Тези данни още веднъж потвърждават, че ефектът на морфиномиметиците (трамадол), както и на трицикличните антидепресанти (амитриптилин), се определя в значителна степен от болковия стимул.

3. Модулация на аналгетичния ефект на COX-инхибиторите от бенфотиамин при модел на невропатична алодиния

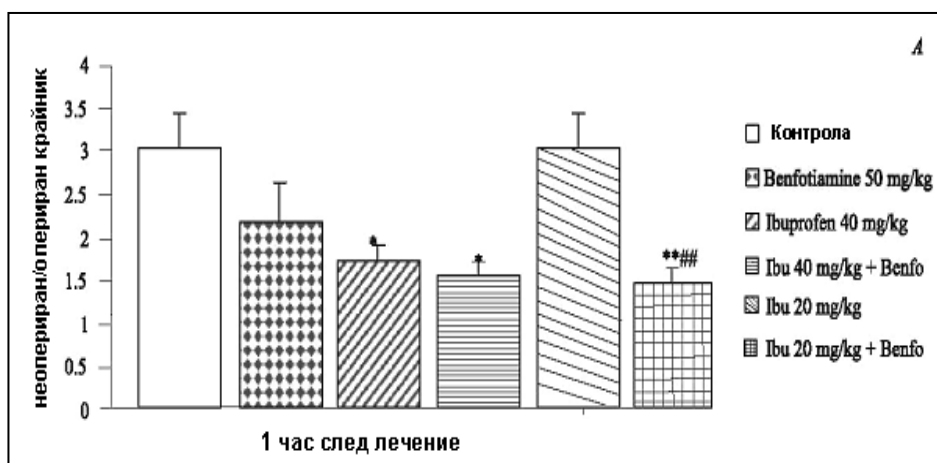
Бенфотиаминът е мастноразтворима форма на витамин B_1 с висока плазмена концентрация и с по-висока степен на преминаване в ЦНС в сравнение с тиамин (Frank et al., 2000).

Схема на третиране

В настоящата серия изследвания експериментални животни със CCI модел на невропатична болка бяха третирани с бенфотиамин в доза 50 mg/kg per os преди констрикцията на седалищния нерв. В отделни серии опити при животни с CCI, бенфотиамин 50 mg/kg се комбинираше с ибупрофен 20 и 40 mg/kg.

Резултати

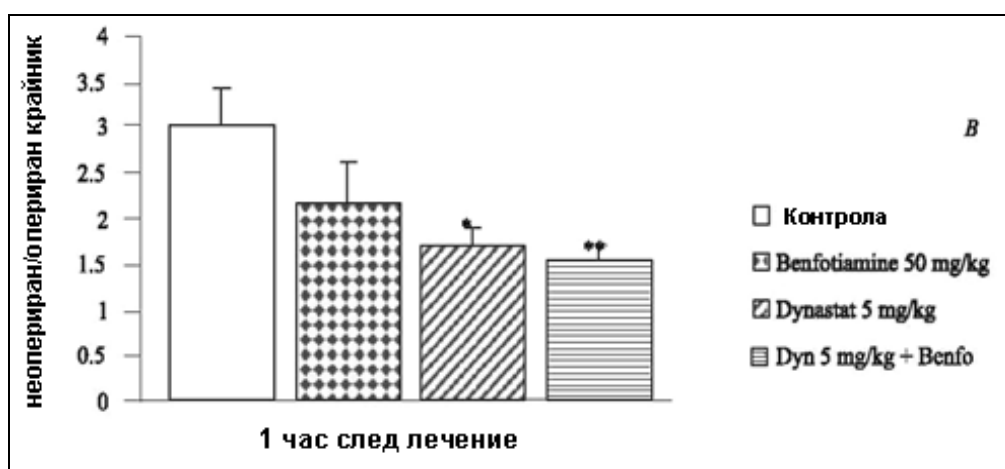
Установено бе, че бенфотиамин 50 mg/kg и ибупрофен 20 mg/kg нямат изразено обезболяващо действие при Incapacitance теста. Комбинацията на бенфотиамин 50 mg/kg с 20 mg/kg ибупрофен води до засилване на аналгетичния ефект на 20 mg/kg ибупрофен, сравним с аналгетичното действие на 40 mg/kg ибупрофен (фиг. 18-А).



Фиг. 18-А. Модуляция на аналгетичния ефект на ибупрофен от бенфотиамин при невропатична болка (CCI) (Incarasitance тест); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контрола; ## $p < 0.01$ спрямо самостоятелно прилагане на ибупрофен (n=6–8)

В аналогична постановка бе изследвано модулиращото действие на бенфотиамин върху аналгетичния ефект на селективния COX₂ инхибитор парекоксиб 5 mg/kg. Както се вижда от фиг. 18-В, бенфотиаминът показва тенденция за засилване на аналгетичния ефект на парекоксиб при CCI невропатична болка и Incarasitance тест.

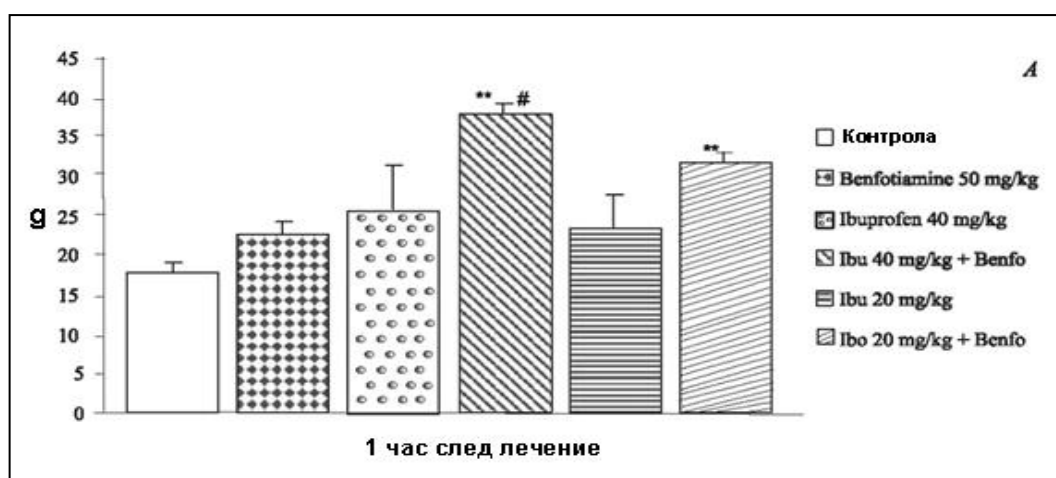
Тези данни дават основание да се приеме, че използването на бенфотиамин като адювант на аналгетичния ефект на препаратите ибупрофен и парекоксиб при невропатична болка ще даде възможност за отпадане на някои НЛР на тези и на други НСПВС, проявяващи се при тяхното приложение в по-големи дози.



Фиг. 18-В. Модуляция на аналгетичния ефект на парекоксиб от бенфотиамин при невропатична болка (CCI) (Incarasitance тест); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контрола, спрямо самостоятелно прилагане на парекоксиб (n=6–8)

Тактилна алодиния

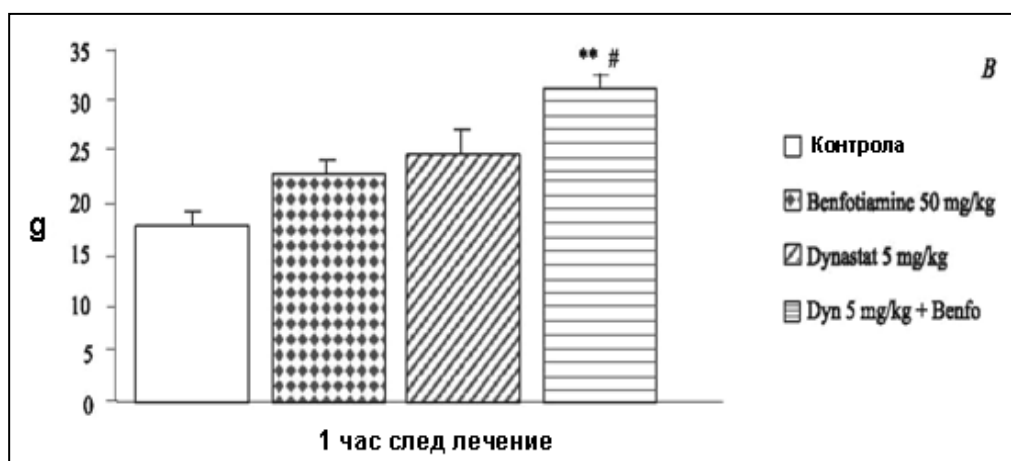
В експерименталната постановка, верифицираща тактилната алодиния, бе установено, че както бенфотиамин 50 mg/kg, така и ибупрофен 20 mg/kg и 40 mg/kg не проявяват антиалодиничен ефект самостоятелно. Комбинираното третиране с бенфотиамин 50 mg/kg + ибупрофен 40 mg/kg водеше до статистически значимо потискане на тактилната алодиния ($p < 0.05$) спрямо ибупрофен 40 mg/kg (фиг. 19-А).



Фиг. 19-А. Модулация на аналгетичния ефект на ибупрофен от бенфотиамин при невропатична болка (CCI) механична алодиния (Von Fray); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контрола; # $p < 0.05$ спрямо самостоятелно прилагане на ибупрофен ($n = 6-8$)

Тук заслужава да се отбележи нееднократно наблюдаваното в експериментални условия явление, че специфичното повлияване на невропатичната болка зависи в значителна степен от използвания стимул. В отличие от инкапацитанс тест, където се наблюдаваше засилване на аналгетичния ефект на ибупрофен 20 mg/kg от бенфотиамин, при Von Fray теста е отбелязано засилване на аналгетичния ефект само на базата 40 mg/kg ибупрофен от бенфотиамин.

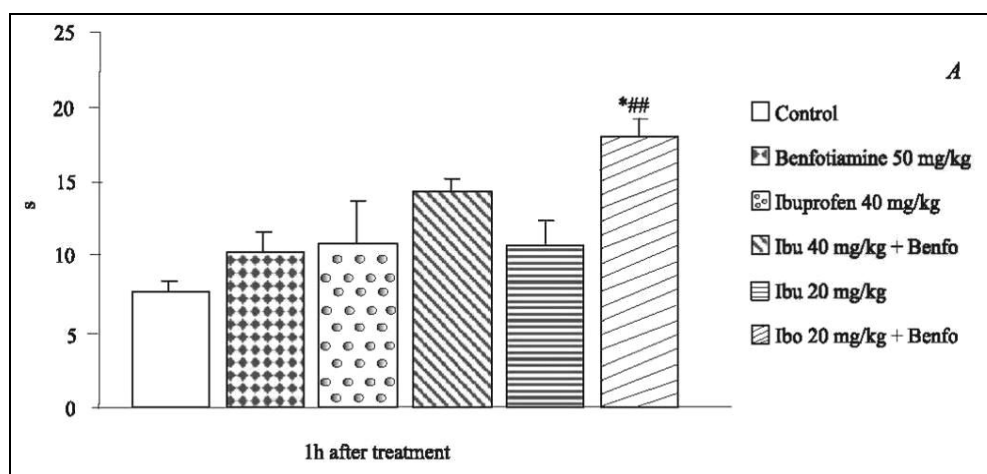
Подобна разлика в силата на наблюдавания модулиращ ефект в зависимост от използвания стимул за механична алодиния се наблюдаваше и при ефекта на парекоксиб 5 mg/kg (фиг. 19-В).



Фиг. 19-В. Модуляция на аналгетичния ефект на парекоксиб от бенфотиамин при невропатична болка (CCI) механична алодиния (Von Fray); ** $p < 0.01$ спрямо контрола; # $p < 0.05$ спрямо самостоятелно прилагане на династат ($n=6-8$)

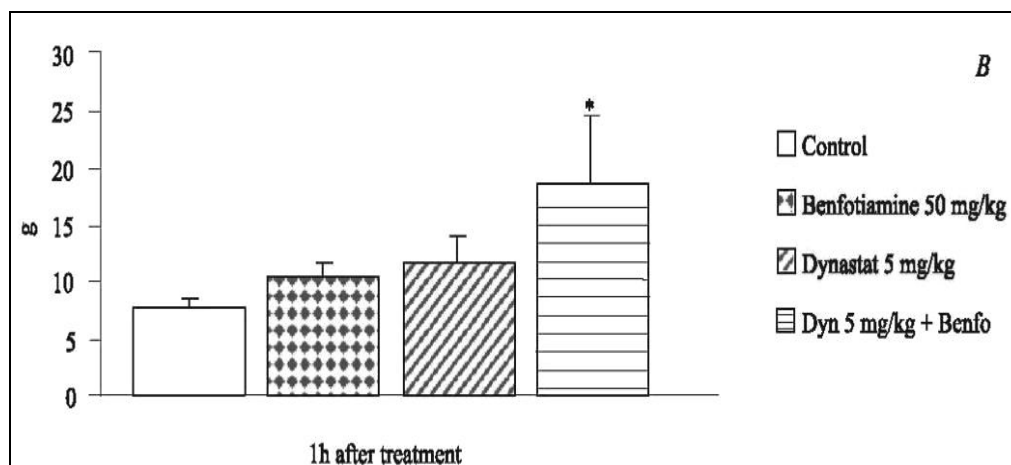
Термична хиперсензитивност

Самостоятелно бенфотиамин 50 mg/kg не повлиява статистически значимо термичната хипералгезия. Както се вижда от фиг. 20-А, при този стимул невропатичната болка не се повлияваше статистически значимо от бенфотиамин 50 mg/kg. Прави впечатление, че комбинацията на бенфотиамин 50 mg/kg с ибупрофен 20 mg/kg води до статистически изразен аналгетичен ефект в сравнение с третираните самостоятелно с бенфотиамин или ибупрофен 20 mg/kg.



Фиг. 20-А. Модуляция на аналгетичния ефект на ибупрофен от бенфотиамин при термална хипералгезия (праг на отдръпване при топлинно дразнене) * $p < 0.05$ спрямо ибупрофен; ### $p < 0.01$ спрямо контрола ($n=6-8$)

Аналогичен ефект на повишаване на болковия праг от бенфотиамин бе установен и при комбинацията с парекоксиб 5 mg/kg при модел ССІ термична хипералгезия (фиг. 20-В).



Фиг. 20-В. Модуляция на аналгетичния ефект на парекоксиб от бенфотиамин при термална хипералгезия (праг на отдръпване при топлинно дразнене)
* $p < 0.05$, спрямо контрола (n=8–10)

Б. НОЦИЦЕПТИВНА БОЛКА: МОДЕЛИ НА ОСТРА И ХРОНИЧНА ВЪЗПАЛИТЕЛНА ХИПЕРАЛГЕЗИЯ

I. ЕФЕКТ НА АНАЛГЕТИЦИ ВЪРХУ МОДЕЛ НА ОСТРА ХИРУРГИЧНА БОЛКА

При тази серия опити бе използван инцизионен модел на остра хирургична болка. Методът се състои в извършване на едностранна плантарна инцизия с дължина 1 cm.

На първия, втория и на 24-ия час след операцията на оперираните животни се определяха ноцицептивните прагове и степента на алодиния. В хода на тези експерименти важен аспект бе проследяването на времевия ход на острата оперативна болка, както и на ефектите на метамизол (аналгин) 150 mg/kg, на парекоксиб 5 mg/kg, приложени по две различни схеми.

Схеми на третиране

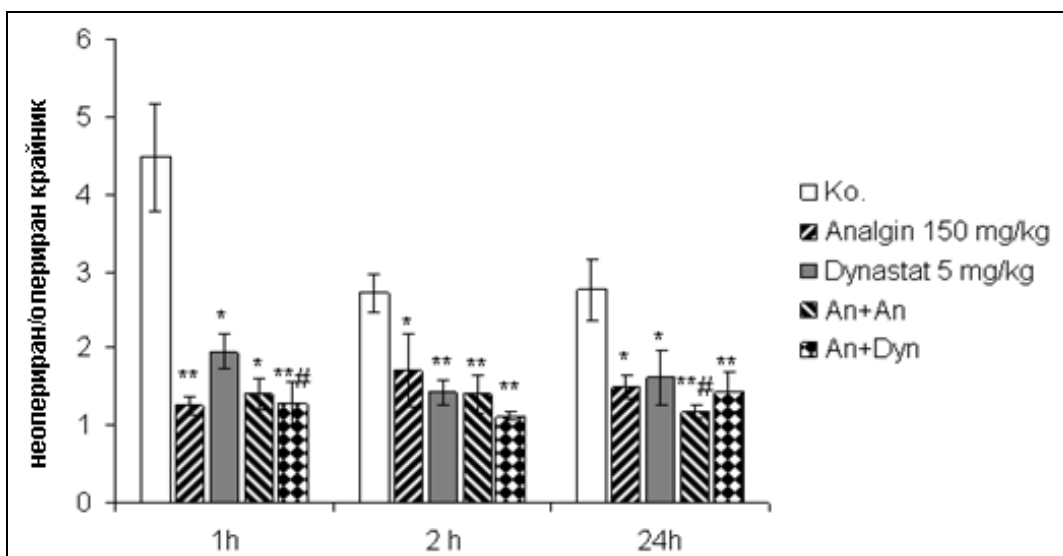
В едната серия експерименти метамизол се прилагаше преди оперативната интервенция, като на една от групите след оперативната интервенция се добавяше метамизол, а на другата парекоксиб. Отделно две от групите бяха третирани след оперативната интервенция, респ. само с метамизол (аналгин) 150 mg/kg и само с парекоксиб 5 mg/kg следоперативно.

Хипералгезията и алодинията се изследваха с методи на Von Frey (динамичен плантарен естезиометър), инкапацитанс тест и тест за натиск върху лапа (PPT). За да се определи времето за развитие на хипералгезия, алодиния и щадене на болния крайник (Инкапацитанс тест), беше извършвано измерване на базовите показатели преди хирургическата интервенция и след това през различни времеви интервали след инцизията на първия, втория и на 24-ия час, а също и на четвъртия ден след операцията.

Резултати

Инцизията на плантарната повърхност на задната лапа предизвикваше сигнификантни промени в Инкапацитанс теста на 1-вия, 2-рия и на 24-тия h след оперативната интервенция.

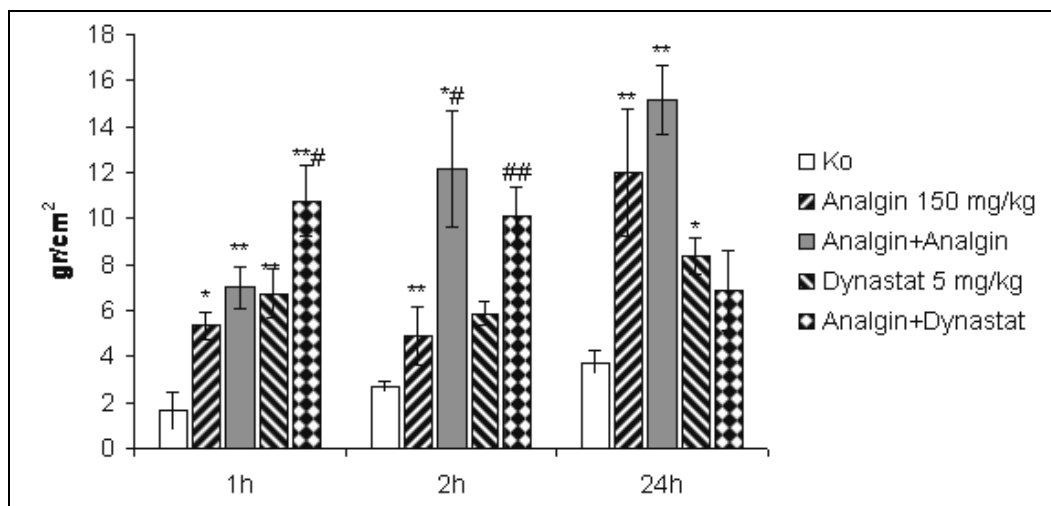
Редукцията на отношението опериран/неопериран беше максимална на първия час след инцизията (4.48 ± 0.69) в сравнение с неоперираните плъхове, при които това отношение бе 1.0 ± 0.02 . Предварителното третиране със 150 mg/kg метамизол повиши аналгетичната активност от 5 mg/kg парекоксиб на 1-ия час след инцизията (1.28 ± 0.27) спрямо (1.95 ± 0.22) самостоятелно приложен парекоксиб (фиг. 21).



Фиг. 21. Време-ефект на аналгин и парекоксиб върху болковата чувствителност (Incarsitance тест); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контрола, # $p < 0.05$ спрямо ефект на еднократна доза аналгин и парекоксиб ($n = 6-8$)

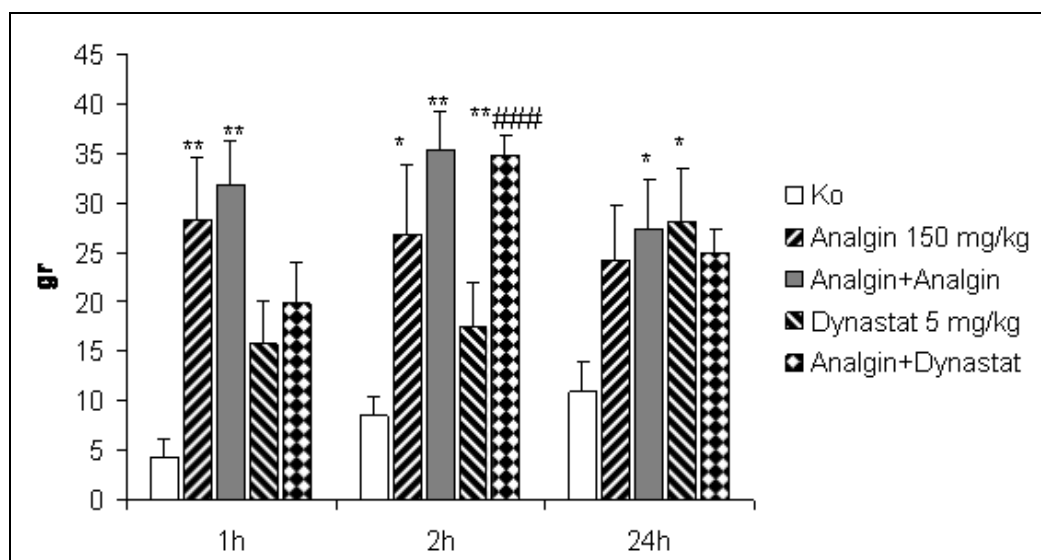
Подобен резултат бе установен на 24-ия час след инцизията, когато се наблюдаваше, че предварителното третиране с аналгин увеличи ефекта на еднократна доза аналгин от 150 mg/kg на 24-тия h (фиг. 28). Редукцията на болковия праг при механична хипералгезия (PPT) беше максимална на първия ден след инцизията (1.63 ± 0.85 , нетретирани плъхове) в сравнение с предоперативния праг (11.5 ± 2.45). Сигнификантен аналгетичен ефект бе наблюдаван при плъховете, третирани с аналгин и парекоксиб на 1-ия и 2-ия час от инцизията (фиг. 22).

Аналгин 150 mg/kg, приложен преди инцизията, повиши значително болковия праг в деня на операцията в сравнение с прилагане само на аналгин или парекоксиб следоперативно (фиг. 22). Този ефект се наблюдаваше в продължение на 24 h.



Фиг. 22. Време-ефект на препаратите аналгин и парекоксиб върху болковата чувствителност (механична хипералгезия); PPT g/cm^2 , * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контрола, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ спрямо ефект на еднократна доза на аналгин и парекоксиб ($n=6-8$)

Повишението на прага на дразнене при тактилна алодиния (von Fray) бе сигнификантно на първия и на третия ден след операцията. Действието на аналгин при тактилната алодиния бе подобно на ефекта му при механична хипералгезия. В този случай предоперативното третиране с аналгин не промени впоследствие аналгин-индуцираната аналгезия (фиг. 23).



Фиг. 23. Време-ефект на аналгин и парекоксиб (династат) върху болковата чувствителност (механична алодиния); Von Fray (g), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контрола, ### $p < 0.01$ спрямо ефект на еднократна доза аналгин и парекоксиб ($n=6-8$)

Системното прилагане на 5 mg/kg парекоксиб не прояви изразен аналгетичен ефект на първия и втория час. Когато се прилагаха 150 mg/kg аналгин преди инцизията, болковият праг се повиши значимо на втория час (34.75 ± 2.18 g) в сравнение с контролите (8.49 ± 1.8) и към третираните с парекоксиб плъхове (17.34 ± 4.7 g).

II. МОДУЛАЦИЯ НА АНАЛГЕТИЧНИЯ, ПРОТИВОВЪЗПАЛИТЕЛЕН И АНТИПИРЕТИЧЕН ЕФЕКТИ НА ИБУПРОФЕН С 18 β -ГЛИЦИРИЗИНОВА КИСЕЛИНА

18 β -глициризиновата киселина е сапогенин, получен от сладкото коренче. Съвременни проучвания показват, че 18 β -глициризинова киселина показва противовъзпалителни, противоязвени, антиалергични, антивирусни, антибактериални и хепатопротективни ефекти (Combest, W., 1998, Shibata, S., 2000; Bombardelli, E., 1989, Aкао, T., 2000).

18 β -глициризинова киселина е инхибитор на ензимите липоксигеназа, циклооксигеназа и протеинкиназа C, които са основни таргети в механизмите на болка, на фебрилна реакция и на възпаление (Wang, Z., 2001).

В настоящото проучване е използвана 18 β -глициризинова киселина като модулатор на аналгетичния, противовъзпалителен и антипиретичен ефекти на ибупрофена.

Инфламаторната хипералгезия се индуцираше с 0.1 ml имплантарно инжектиране на 1% карагенин. Механичната хипералгезия се измерваше с РРТ на 1-ия, 2-ия, 3-ия, 4-ия и 5-ия час след инжектирането на карагенин.

Фебрилната реакция се предизвикваше с инжектиране на 20% суспенсия от бирена мая в доза от 1 ml/100 g т.м., инжектирана подкожно 1 h преди прилагане на ибупрофен, 18 β -глициризинова киселина и комбинация.

Схема на третиране

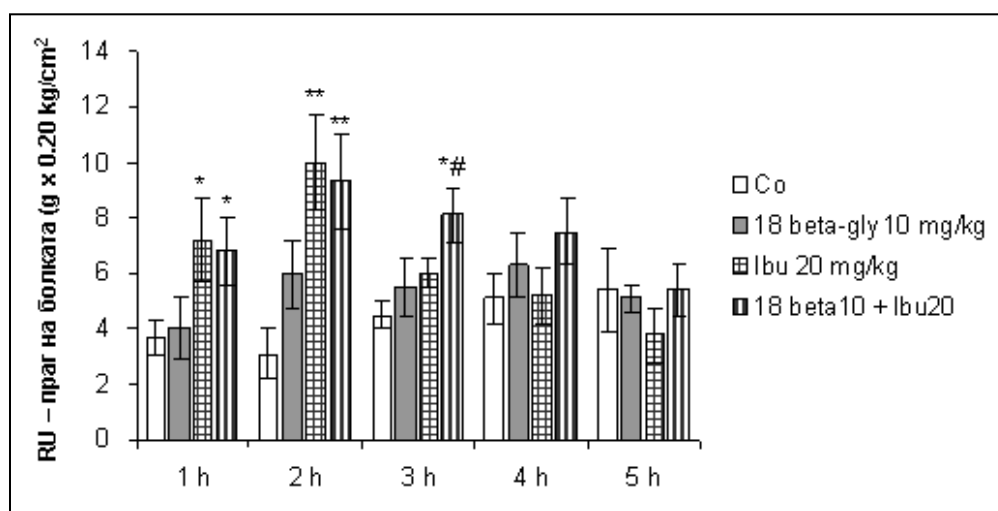
Плъховете се третираха перорално с 10 mg/kg 18 β -глициризинова киселина, с ибупрофен 20 и 40 mg/kg или комбинация.

1. Модулиране на аналгетичния ефект на ибупрофен от 18β-глициризиновата киселина

Резултати

Еднократното третиране с 18β-глициризинова киселина в доза 10 и 20 mg/kg не показва аналгетична активност върху базалната ноцицепция при РРТ. Инжектирането на карагенин води до изразена остра инфламаторна хипералгезия. Прагът на отдръпване на възпалената лапа намалява от 10.3 ± 2.2 RU (преди инжектирането на 3.1 ± 0.9 RU на 1-ия час след карагениновото инжектиране. Третирането с ибупрофен повиши прага на болково отдръпване (фиг. 24 и 25).

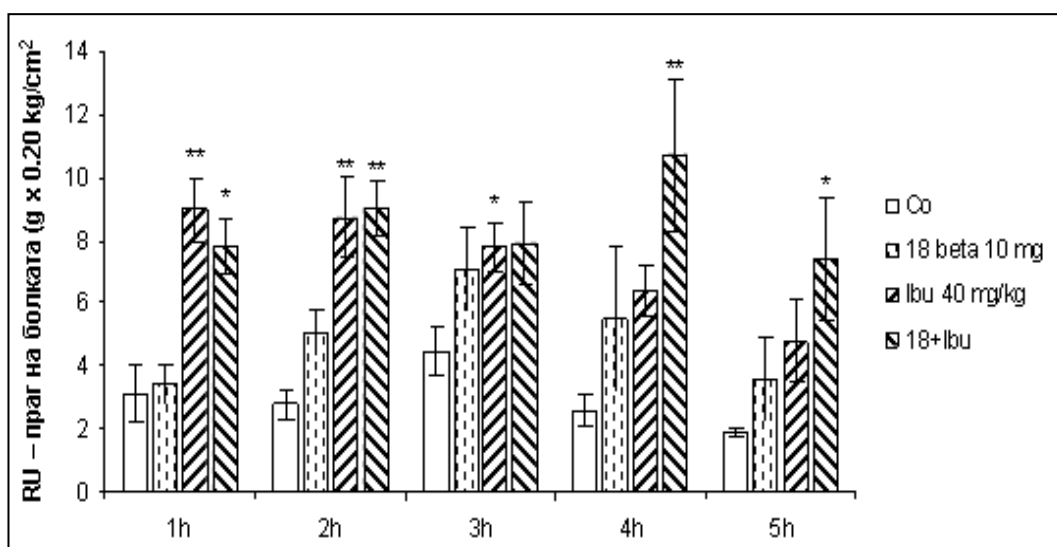
Третирането с 18β-глициризинова киселина 10 mg/kg не промени сигнификантно болковия праг. Комбинацията на 18β-глициризинова киселина 10 mg/kg удължи аналгетичния ефект на ибупрофен 20 mg/kg след 3-ия час (фиг. 24). Аналгетичната активност на комбинацията на 3-ия час бе сигнификантно по-висока в сравнение с ефекта на самостоятелно приложен ибупрофен 20 mg/kg (фиг. 24).



Фиг. 24. Ефект на 10 mg/kg на 18β-глициризинова киселина, 20 mg/kg ибупрофен и комбинация от двете върху карагенин-индуцирана хипералгезия при тест РРТ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контрола (карагенин); # $p < 0.05$ спрямо самостоятелно прилагане на ибупрофен ($n=6-8$)

Подобни резултати бяха установени при комбиниране на 18 β -глицеризинова киселина 10 mg/kg и ибупрофен 40 mg/kg (фиг. 25). Заслужава да се отбележи, че комбинацията води до сигнификантно аналгетична активност на 4-тия и на 5-тия h от карагенин-индуцираната хипералгезия. На 4-тия h след карагениновото прилагане, само комбинираното прилагане на ибупрофен 20 mg/kg и 18 β -глицеризинова киселина 10 mg/kg показва аналгетична активност, статистически значима и сравнима с ефекта на 40 mg/kg ибупрофен.

Тези данни показват, че 18 β -глицеризинова киселина е потенциален адювант на противовъзпалителното и аналгетично действие на ибупрофен и позволява успоредно с удължаване на аналгетичния ефект да се намали наполовина ефективната доза на ибупрофен (фиг. 25).

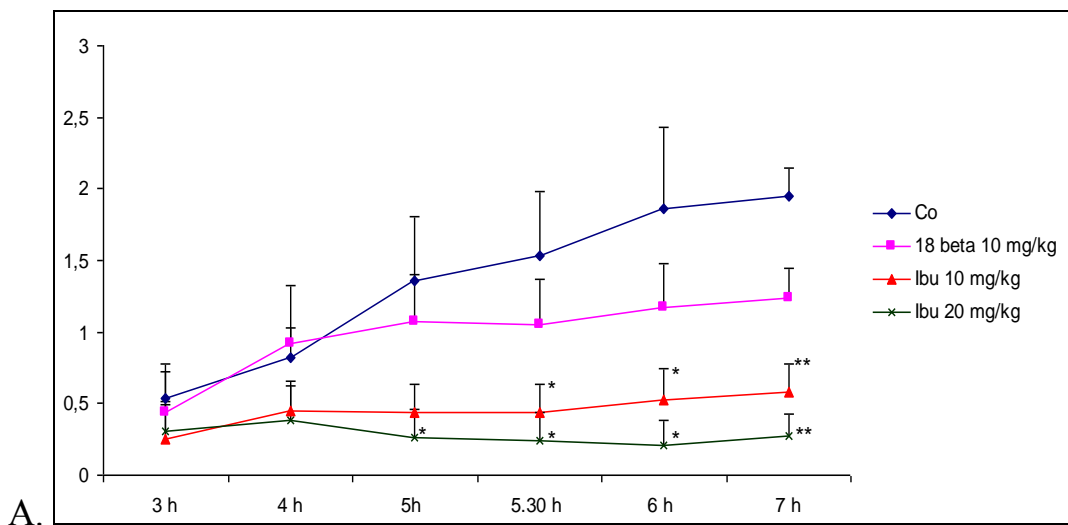


Фиг. 25. Ефект на 10 mg/kg 18 β -глицеризинова киселина, 40 mg/kg ибупрофен и комбинация от двете върху карагенин-индуцирана хипералгезия при тест РРТ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контрола (карагенин) (n=6–8)

2. Модулиране на антипиретичния ефект на ибупрофен от 18 β -глицеризиновата киселина

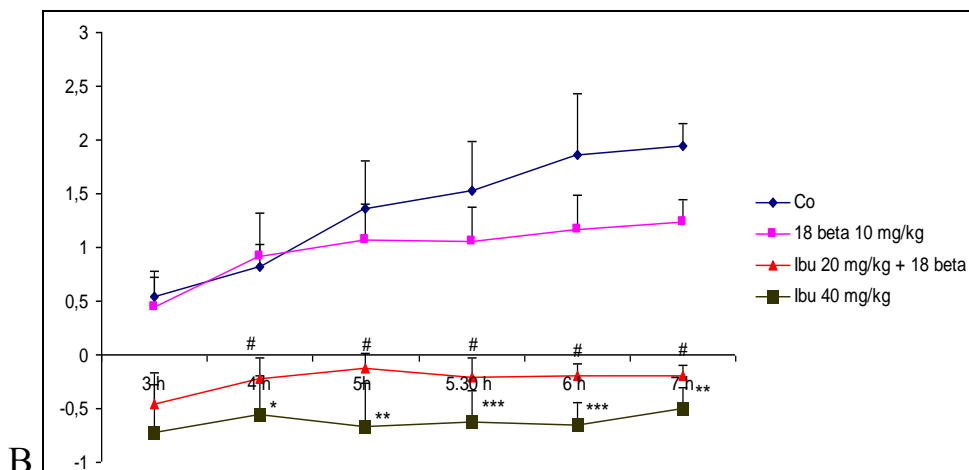
Подобни резултати бяха установени и при изследване на модуляцията на антипиретичния ефект на ибупрофен от 18 β -глицеризинова киселина. Установено бе, че ректалната температура се

повишаваше прогресивно, достигайки максимум на 7-ия час след инжектиране на бирена мая, като се повишаваше с $1.95 \pm 0.21^\circ\text{C}$ над базалното ниво (37.06 ± 0.2). 18β -глицеризинова киселина 10 mg/kg показва скромнен, но сигнификантен антипиретичен ефект, понижавайки температурата с $1.24 \pm 0.23^\circ\text{C}$ (на 7-ия час след фебрилната индукция) (фиг. 26-А, 26-В). Ибупрофен 10 и 20 mg/kg показва сигнификантна антипиретична активност (фиг. 26-А).



Фиг. 26-А. Ефект на 18β -глицеризинова киселина (10 mg/kg) и ибупрофен (10 и 20 mg/kg) върху ректалната телесна температура; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контрола; # $p < 0.05$ спрямо самостоятелно прилагане на ибупрофен ($n=6-8$)

Ибупрофен 40 mg/kg превантира повишаването на телесната температура от инжектиране на бирена мая (фиг. 26-В). Заслужава да се отбележи, че комбинацията на 18β -глицеризинова киселина 10 mg/kg с ибупрофен 20 mg/kg показва сигнификантно по-силен антипиретичен ефект в сравнение със самостоятелно приложения ибупрофен 20 mg . Ректалната температура се повиши с $0.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$ на 7-ия час след инжектиране на бирена мая (фиг. 26-В). Антипиретичната активност на комбинацията беше статистически значимо по-силна в сравнение със самостоятелното прилагане на ибупрофен самостоятелно 20 mg/kg или само 18β -глицеризинова киселина 10 mg/kg .



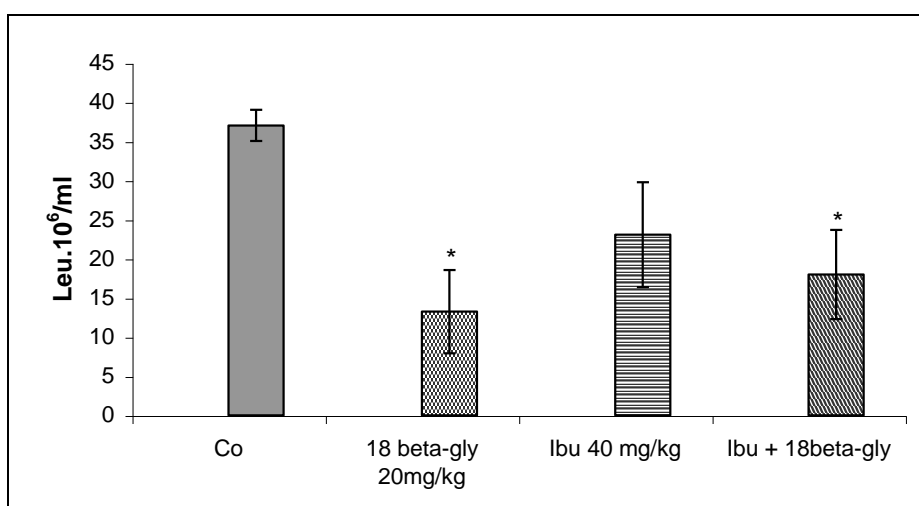
Фиг. 26-В. Ефект на 18β-глицирисинова киселина (10 mg/kg), ибупрофен (40 mg/kg) и комбинация от 18β-глицирисинова киселина и ибупрофен върху ректалната телесна температура; *p<0.05, **p<0.01 спрямо контрола; #p<0.05 спрямо самостоятелно прилагане на ибупрофен (n= 8–10)

Наблюдаваният ефект върху аналгетичното и антипиретично действие на 18β-глицирисинова киселина, съчетан с вкусовите качества на сладкото коренче, са основание екстрактът от сладкото коренче да се използва за изготвяне на сиропни форми на ибупрофен за понижаване на телесната температура и за обезболяване. С използването на екстракта от сладко коренче се постига както подобряване на вкусовите качества, така и намаляване на ефективната доза ибупрофен, което пък намалява рисковете от НЛР, специфични за СОХ-инхибиторите.

3. Ефект на ибупрофен и 18β-глицирисинова киселина самостоятелно и в комбинация върху левкоцитната инфилтрация и нивата на PGE₂ при карагенин-индуцирано възпаление

Голямото предимство на метода на Higgs et al. (1976) е възможността да се проучи ефектът на ибупрофен плюс 18β-глицирисинова киселина за период от 24 часа върху инвазията на левкоцити и продукцията на простагландини във възпалителния ексудат. Намерихме, че в импрегнираната гъба е налице инвазия на левкоцити, 98% от които са полиморфонуклеари (PMN). Броят на PMN в ексудата на контролната група е $37.05 \pm 1.99 \times 10^6 / \text{cm}^3$.

Ibuprofen 40 mg/kg редуцира броя на PMN с 38% ($23.1 \pm 6.7 \times 10^6 / \text{cm}^3$), без да достигне статистическа значимост. Третирането с 20 mg/kg 18β -glycyrrhethinic acid самостоятелно и комбинацията от ibuprofen 40 mg/kg плюс 20 mg/kg 18β -glycyrrhethinic acid редуцира броя на клетките с 64% ($13.25 \pm 5.33 \times 10^6 / \text{cm}^3$) и 51% ($18.0 \pm 5.7 \times 10^6 / \text{cm}^3$), респективно ($p < 0.05$) (фиг. 27). Нивата на PgE_2 във възпалителния ексудат на контролната група са 57.86 ± 5.34 pg/ml. Прилагането на 18β -glycyrrhethinic acid предизвиква умерено редуциране на нивата на PgE_2 – от 15 до 21%. Ibuprofen понижава PgE_2 нивата с 39% ($p < 0.05$). Подобен ефект бе наблюдаван при групата, третирана с комбинацията 18β -glycyrrhethinic acid и ibuprofen, без да е налице значима разлика със самостоятелно приложен ibuprofen.



Фиг. 27. Промени в броя на белите кръвни клетки в карагенин-индуциран възпалителен ексудат; * $p < 0.05$, спрямо контрола ($n = 6-8$)

4. Ефект на ibuprofen плюс 18β -glycyrrhethinic acid в сравнение със самостоятелния ефект на ibuprofen върху развитието на ревматоидно възпаление (адювантен артрит) и хипералгезия

Острата фаза на възпаление (в инжектираната лапа) достига максимума си след 3–5 дни, а имунната фаза на CFA артрит се развива след 7–10 дни. Възпалението в ставите (инокулираните и

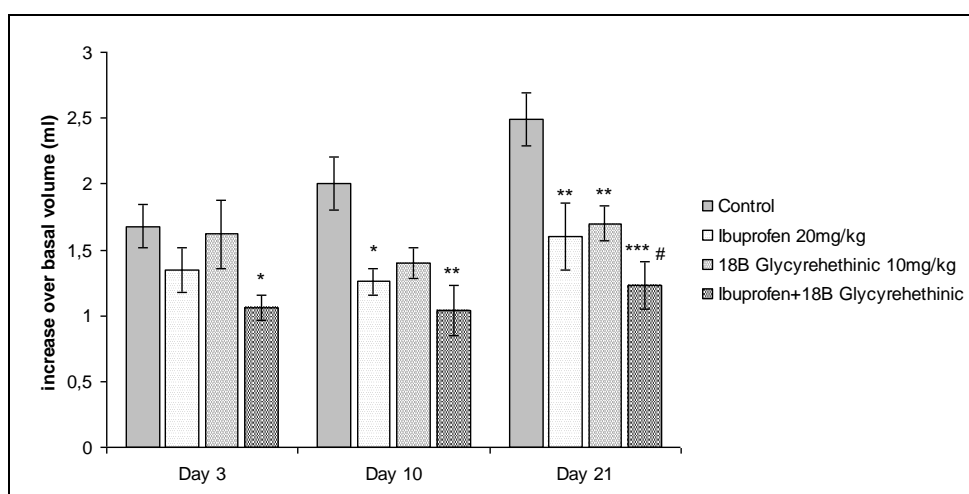
неинокулираните), загубата на т.м. и хипералгезията се развиват прогресивно до 21-ия ден.

4.1. Проследяване на противовъзпалителното действие чрез плетизмометричен метод

Инжектирането на CFA индуцира изразен оток на задната лапа както в острата, така и в хроничната фаза. В острата фаза (3-ти ден) *ibuprofen* (40 mg/kg) статистически значимо редуцира с 45% обема на лапата в сравнение с този на нетретираните артритни пълхове ($p < 0.05$). Ниската доза *ibuprofen* (20 mg/kg) редуцира отока с 20% (фиг. 28).

Едновременното прилагане на 18 β -glycyrrhetic acid и *ibuprofen* (20 mg/kg) проявява антиексудативен ефект, превишаващ този на *ibuprofen* 20 mg/kg на 3-ия ден. Комбинацията инхибира отока с 37% в сравнение с нетретираните пълхове ($p < 0.05$) (фиг. 28).

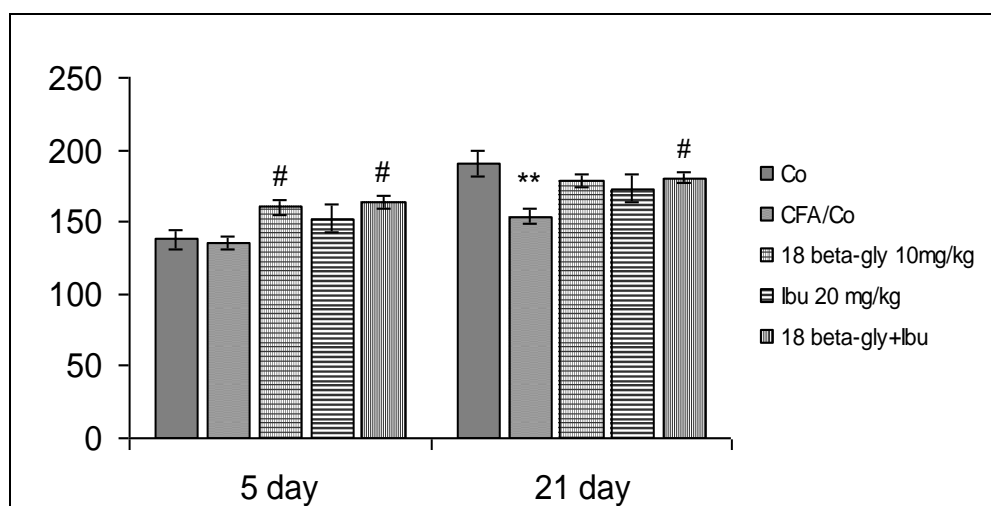
Продължителното лечение на артритните пълхове с ниски дози *ibuprofen* (20 mg/kg) в комбинация с 18 β -glycyrrhetic acid проявява мощен антиексудативен ефект (50% инхибиция; $p < 0.01$) (фиг. 28).



Фиг. 28. Ефект на ибупрофен 20 mg/kg, 18 β -глициризинова киселина, 10 mg/kg и комбинация от двете върху отока на лапа при адювантен артрит на пълхове; ** $p < 0.01$ спрямо контрола адювантен артрит ($n = 6-8$)

4.2. Ефект на ибупрофен и 18 β -glycyrrhetic acid върху промяната на телесната маса при адювантен артрит

CFA-третираните плъхове губят т.м. в сравнение с плъховете, които не са развили артрит. Разликата в телесната маса между двете групи животни е статистически значима ($p < 0.01$) на 21-вия ден (фиг. 29). Третирането с ибупрофен плюс 18 β -glycyrrhetic acid предотвратява загубата на т.м. (фиг. 29), което съвпада с атенюиране на други поведенчески белези на артрит (зачервяване, оток и нарушена функция на възпалената лапа).

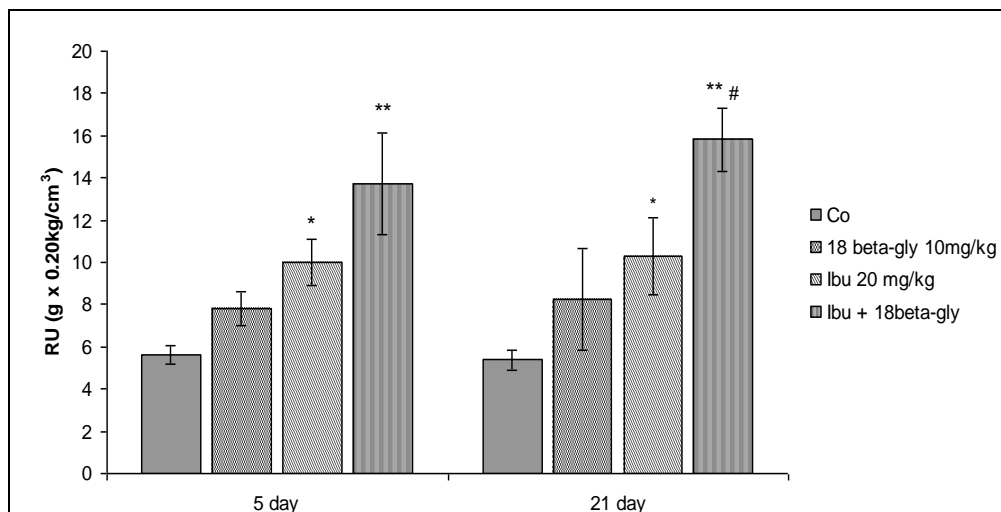


Фиг. 29. Промени в т.м. (g) след продължително третиране с 18 β -глицирзинова киселина, ибупрофен и комбинация от двете вещества при адювантен артрит на плъхове (n=6–8)

4.3. Ефект на 18 β -glycyrrhetic acid, ибупрофен и тяхната комбинация върху CFA-индуцирана механична хипералгезия (PPT)

PPT показва значимо понижаване на прага на отдръпване от 13.8 ± 2.01 RU при здрави животни до 6.2 ± 0.45 RU при артритни плъхове на 5-ия ден от инокулацията (фиг. 30). В острата фаза на възпалението (5-и ден) 2 h след третиране с 10 mg/kg 18 β -glycyrrhetic acid и ибупрофен (20 mg/kg) болковият праг се повишава значимо ($p < 0.5$) (фиг. 30). Едновременното приложение на двата агента показва подобна аналгетична активност. На 21-вия ден (хронична фаза)

ibuprofen (20 mg/kg) проявява значима аналгетична активност при РРТ ($p < 0.5$) (фиг. 30). Комбинацията проявява мощен аналгетичен ефект ($p < 0.01$), който превишава този на самостоятелно приложен ibuprofen ($p < 0.5$).



Фиг. 30. Ефект на 18β-глициризинова киселина, 10 mg/kg, ибупрофен 20 mg/kg и комбинация от двете върху механична хипералгезия при тест за натиск върху лапа при модел на адювантен артрит на плъхове; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо адювантен артрит; # $p < 0.05$ спрямо 20 mg ибупрофен ($n = 6-8$)

ОБСЪЖДАНЕ

Констрикцията на n. ischiadicus е класически модел за периферно нервно увреждане (Bennett, G. J. et al., 1988, 1998). Механична алодиния и термична хипералгезия се развиват обикновено една седмица след констрикцията на нерва и продължават до 2–3 седмици (Martin, T. J., J. C. Eisenach, 2001).

От проведените серии експерименти за поведенческа изява на невропатната болка при модел на хронична констриктивна увреда в зависимост от прилаганите различни (специфични) стимули, бе установена тактилна алодиния и в различна степен механична и термична хипералгезия.

Различните прояви на невропатната болка се повлияват в различна степен от широко използваните в клиничната практика аналгетици. Ефектът на метамизол, както и на другите аналгетици, в значителна степен се определя от стимулите, предизвикващи алодиния/болка.

Морфинът проявява по-силно изразен аналгетичен ефект в сравнение с метамизола при тест Von Fray и Plantar heat test.

Спонтанната проява на болка при Incapacitance тест в много по-слаба степен се повлиява от приложения морфин.

Подобни ефекти бяха установени и при прилагане на трамадол и амиприптилин.

При теста за натиск върху лапата трамадолът прояви своя аналгетичен ефект, докато амитриптилинът няма антиалодиничен/аналгетичен ефект.

Проведените експерименти потвърждават становището, че класическите аналгетици (опиоиди и НСПВС) не повлияват еднозначно болката при различните модели на невропатична болка,

което аргументира търсенето ни на различни подходи и адюванти, допълващи техния аналгетичен ефект.

Бенфотиаминът представлява мастноразтворима форма на вит. В₁ с по-висока плазмена концентрация и по-висока степен на преминаване в нервната система от тиамин. Използването на бенфотиамин като адювант на аналгетичния ефект на ибупрофен при невропатна болка ще даде възможност за отслабване на нежеланите лекарствени реакции на ибупрофен и други НСПВС, проявяващи се от по-високите дози.

Резултатите показват, че бенфотиаминът проявява изразен модулиращ ефект върху аналгетичния ефект на СОХ-инхибитори при модел на невропатична болка.

Установено е, че след констрикция на n. ischiadicus невроните на задния рог стават свръхвъзбудими и реагират абнормно на възпалителни медиатори (Song, X. J. et al., 2003, 2008; Zhu X, Eisenach, J. M., 2003; Zeilhofer et al., 2003).

Zhu и Eisenach допускат, че СОХ₁ експресията в гръбначния мозък не е статична, но се променя във времето в зависимост от типа на нервна увреда. При модел на СС1 е установено, че в гръбначния мозък на плъховете се наблюдава сигнификантно увеличаване експресията на СОХ₂ и инфилтрирането с макрофаги (Durrenberger, P. et al., 2006).

В нашите проучвания ибупрофен 20 mg/kg и 40 mg/kg като неселективен СОХ-инхибитор и династат 5 mg/kg (който бързо се метаболизира до валдекоксид като селективен СОХ₂-инхибитор самостоятелно не променя тактилната алодиния и термична хиперчувствителност, макар че династат потиска болката при Инкапацитанс тест. Предишни проучвания показват, че високи дози от вит. В₁, В₆ и В₁₂, прилагани поотделно или в комбинация могат да отслабят острата невропатна болка и да потенцират аналгезията, предизвикана от неопиоидни аналгетици като НСПВС (Jurna, I., 1998).

Бенфотиаминът като мастноразтворима тиаминова форма притежава висока бионаличност (Loew, 1996) и показва терапевтична ефективност при третиране на алкохолна полиневропатия и болка при диабетна невропатия (Haupt, E. et al., 2005; Woelk, H. et al., 1998).

Нашите данни са едни от първите на експериментални животни с прецизиран модел на увреда на n. ischiadicus, които показват позитивно взаимодействие между COX-инхибиторите и бенфотиамин. Установено е, че системното приемане перорално на 50 mg/kg бенфотиамин отслабва болковото поведение, но не показва сигнификантно потискане на тактилната алодиния и термична хиперсензитивност при CCI модел на невропатна болка. Резултатите показват, че комбинираното прилагане на бенфотиамин с ибупрофен или парекоксиб статистически значимо потискат тактилната алодиния, термичната хипералгезия и болковото поведение при плъховете. Изразеният засилващ ефект на бенфотиамина в комбинация с ибупрофен позволява понижаване терапевтичната доза на ибупрофен, което резултира в отслабване на нежеланите лекарствени реакции, специфични за COX-1 и 2 инхибиторите.

Постоперативната болка е остра и продължителна и независимо от напредъка при контрола ѝ като цяло, в 60% от случаите тя остава незадоволително повлияна (Chauvin, 1999). Този проблем подтиква клиничните и експериментални проучвания за изясняване на патогенетичните звена и търсенето на ефективни терапевтични подходи. В настоящото проучване показахме, че механичната хипералгезия, тактилната алодиния и промените в щаденето на лапата се развиват в постоперативния период между 1-ви и 3-ти ден след инцизията. Установихме, че механичната хипералгезия бе най-проявена от 1-ви до 24-ти час след оперативната намеса. Ефектът на метамизол и династат след еднократно прилагане (30–40 min след инцизията) бе проследяван на 1-ви, 2-ри и 24-ти час след третирането и след инцизията. Установено бе, че както механичната хипералгезия,

така и тактилната алодиния могат да бъдат потиснати от своевременно третиране с метамизол и династат. Династатът бе по-ефективен при механична хипералгезия в сравнение с тактилна алодиния. Данните за ефикасността на COX-инхибиторите върху плантарна инцизия индуцирана болка са доста противоречиви. Някои от тях демонстрират, че постхирургическото интратекално прилагане на COX₂ инхибитори няма ефект върху инцизия-индуцираното поведение (Kroin, J. S. et al., 2002; Zhu, X. et al., 2003).

Други автори като Yamamoto et al. и Whiteside et al. показват, че системното прилагане на индометацин или селективен COX₂ инхибитор може да намали тактилната алодиния, механична хипералгезия и щаденето на лапата.

В настоящото проучване както метамизол, така и династат показаха ефективност в потискане на механичната хипералгезия и щаденето на оперирания крайник. Династат бе по-ефективен при механична хипералгезия, отколкото при тактилна алодиния в ранния постоперативен период, докато метамизол прояви аналгетична ефективност във всички използвани експериментални методи. Метамизол потенцира морфин-индуцираната антиноцицепция при метамизол третирани, както и при морфин толерантни плъхове (Hernández-Delgadillo, G. P, 2004).

В нашите експерименти установихме, че предварителното третиране с метамизол повиши ефикасността на еднократно приложен династат върху хипералгезия, алодиния и щадене на лапата. Може да се допусне, че разликата между ефектите и потентността на метамизол и династат се обуславят от фармакодинамичните им свойства и разбира се, от различните механизми на болката, предизвикани от различни стимули.

В заключение, това проучване демонстрира, че интраперитонеалното прилагане на метамизол и на COX₂-инхибитора династат потискат постоперативната болка, предизвикана чрез

инцизия на лапата на плъха. Този експериментален модел дава възможност за проучване на механизмите на постоперативна аналгезия.

Основният механизъм на действие на НСПВС е простагландиновото блокиране чрез инхибиция на циклооксигеназата (COX). Резултатът на това действие основно е да редуцира острото възпаление, периферната и централната сензитизация, което води до аналгетичен, антипиретичен и противовъзпалителен ефект. PGE₂ е мощен хипералгетичен (Heinricher et al., 2004; Kassuya et al., 2007) и пирогенен (Nakamura et al., 2002) агент. В нашите изследвания ибупрофен (20, 40 mg/kg) прояви аналгетичен ефект върху карагенин-индуцираната хипералгезия. Последната, от своя страна, се извява като последствие на сензитизацията на първичните аферентни ноцицептори (Hoffmann, 2000).

18β-глициризиновата киселина е сапогенин, получен от сладкото коренче. Съвременни проучвания показват, че 18β-глициризинова киселина показва противовъзпалителни, противоязвени, антиалергични, антивирусни, антибактериални и хепатопротективни ефекти (Combest, W., 1998, Shibata, S., 2000; Bombardelli, E., 1989, Aкао, T., 2000). Тя е инхибитор на ензимите липоксигеназа, циклооксигеназа и протеинкиназа C, които са основни таргети в механизмите на болка, на фебрилна реакция и на възпаление (Wang, Z., 2001).

Самостоятелното лечение с 10 βmg/kg 18β-глициризинова киселина не проявява аналгетична активност върху карагенин-индуцираната хипералгезия. Същевременно 10 mg/kg 18β-глициризинова киселина значително намалява индуцираната от бирената мая пиретична реакция в 7-мия час. Глициризиновата киселина е инхибитор на липоксигеназата и циклооксигеназата (Wang, Z., 2001), като би могло да се предположи, че установените ефекти се дължат на периферна и централна инхибиция на COX-активността.

Тази хипотеза е допълнително потвърдена и от *ex vivo* наблюдаваната инхибиция върху P_gE₂ нивата.

Комбинацията на 18β-глициризинова киселина с ибупрофен в ниски дози (20 mg/kg) проявява значително удължено аналгетично действие в сравнение с монотерапията с 20 mg/kg ибупрофен. Ползите от комбинирана терапия с 18β-глициризинова киселина бяха потвърдени и при пиретичната реакция, индуцирана от бирена мая. 18β-глициризинова киселина е инхибитор на ензимите липоксигеназа, циклооксигеназа и протеинкиназа C, които са основни таргети в механизмите на болка, фебрилна реакция и възпаление (Wang, Z., 2001).

Експерименталните модели на възпалението бяха използвани да потвърдят ефектите на комбинацията на 18β-глициризинова киселина с ибупрофен. Използвайки метода на Higgs and Vane (1976) ние демонстрирахме в съответствие с Bombardelli et al. (1989) че 18β-глициризинова киселина значително потиска левкоцитната инвазия във възпалителния ексудат. Този ефект води до супресия на развитието на възпалителната реакция, което ибупрофенът самостоятелно не прави. Комбинацията 18β-глициризинова киселина и ибупрофен намалява значително PMN инфилтрация.

Тези данни са в съответствие с нашите резултати върху развитието на възпалителната реакция при адювантен артрит на Фройнд. Беше демонстрирано, че ибупрофен (20 mg/kg и 18β-глициризинова киселина (10 mg/kg) намаляват значително обема на лапата толкова значимо, колкото ибупрофен (40 mg/kg) на третия ден.

Още повече, че продължителното лечение с по-ниски дози ибупрофен и 18β-глициризинова киселина потискат значително развитието на артритния оток. Нашите данни показват, че използването на по-ниски дози ибупрофен в комбинация с 18β-глициризинова киселина има значителен обезболяващ ефект при артритните плъхове. Наблюдаваният ефект би могъл да се дължи на

инхибиция на COX от ибупрофен (виж по-горе), на LOX от 18 β -глициризинова киселина (Wang, Z, 2001), както и на инхибиция на ензима 11-[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase (Teelucksingh, S, 1990).

В заключение, нашите данни потвърждават твърдението, че чрез използването на комбинация на ибупрофен 18 β -глициризинова киселина е възможно да се намали рискът от странични реакции на ибупрофен (улцерогенеза), докато се поддържа високата противовъзпалителна и обезболяваща ефикасност.

Представеното от нас цялостно проучване разкрива и възможности за използване на бенфотиамин и 18 β -глициризинова киселина като адюванти за засилване на аналгетичното/антиалодинично действие на клинично значими аналгетици при модели на невропатна алодиния и възпалителна хипералгезия.

ИЗВОДИ

1. При модел на невропатична болка (констрикция на п. ischiadicus) изследваните аналгетици проявяват различен по сила ефект в зависимост от прилагания стимул за отчитане на специфични еквиваленти на невропатия при човек.

2. Прилагането на бенфотиамин като адювант води до засилване на аналгетичния ефект на НСПВС при невропатична алодиния. Това е предпоставка за намаляване на дозата на НСПВС с цел постигане на антиалодинично действие и намаляване на риска от прояви на НЛР, които при тези лекарства са сериозни и дозозависими.

3. При остра постоперативна болка антиалодиничният ефект на парекоксиб е по-ефективен при механична хипералгезия, отколкото при тактилна алодиния.

4. Претретирането с метамизол води до усилване и удължаване на антиноцицептивното действие на прилаганите аналгетици при модел на постоперативна болка.

5. 18β -глициризиновата киселина засилва аналгетичния, антипиретичен и противовъзпалителен ефекти на ибупрофен при модели на остро и хронично ревматоидно възпаление.

6. 18β -глициризиновата киселина самостоятелно и в комбинация с ибупрофен потиска инвазията на възпалителното огнище с полиморфонуклеарни левкоцити. Този модулиращ ефект повлиява важен патогенетичен механизъм на възпалението, който не се влияе от самостоятелно прилагане на ибупрофен.

ПРИНОСИ

1. Приноси с методологично значение

1.1. Разработени и валидирани са експериментален модел на невропатична болка с констрикция на n. ischiadicus, модел на остра постоперативна болка и модел на остро възпаление чрез имплантиране на напоени с карагенин полиестерни гъбички подкожно, позволяващ изследване на левкоцитна инвазия и простагландинова биосинтеза във възпалителното огнище.

2. Приноси с фундаментално и приложно значение

2.1. За първи път е установено е, че бенфотиаминът модулира аналгетичното действие на COX-инхибитори при модел на невропатична болка.

2.2. За първи път е показано, че 18 β -глициризиновата киселина модулира ефектите на НСПВС върху левкоцитната инвазия във възпалителното огнище.

2.3. Установено е, че 18 β -глициризиновата киселина засилва аналгетичния, противовъзпалителен и антипиретичен ефекти на ибупрофен. Като се има предвид, че 18 β -глициризиновата киселина е основна съставка в сладкото коренче (*Glycyrrhiza glabra L.*), последното може да бъде използвано за потенциране на основните ефекти на НСПВС и за намаляване на техните НЛР.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ

1. Surcheva, S., V. Tzvetkova, **N. Yanev**, N. Surchev, M. Vlaskovska, L. Kazakov. Benfotiamine modulates analgesic effect of cox-inhibitors. Studies on neuropathic allodynia. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, vol. 59 (11), **2006**, 1203–1208.
2. **Yanev, N.**, S. Surcheva, P. Kraevsky, N. Bovjanska, L. Surchev, L. Kasakov, M. Vlaskovska. Rat model of incisional pain. Comparative study on the analgesic effect of metamizol (analgin) and dynastat. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, vol. 59 (12), **2006**, 1313–1318.
3. Surchev L., Sl. Surcheva. **N. Yanev**, L. Kasakov, M. Vlaskovska. Comparative assessment of the morphological equivalents in two experimental rat models of neuropathic pain. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, vol. 61 (8), **2008**, 1079–1085. IF 0.152.
4. **Yanev, N.**, S. Surcheva, L. Kasakov, M. Vlaskovska. 18 β -glycyrrhetic Acid Modulates Anti-Inflammatory Effect of Ibuprofen. Studies on Experimental Models of Rheumatoid Inflammation and Inflammatory Hyperalgesia. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, **2011**, vol. 64 (2), 299–310. IF 0.219.
5. Surcheva, S., **N. Yanev**, S. Michailova, L. Kasakov, M. Vlaskovska. Experimental Studies on the Analgesic and Antipyretic Effects of Ibuprofen Combined with 18 β -glycyrrhetic Acid. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, **2011**, vol. 64 (3), 443–448. IF 0.219.

УЧАСТИЕ В УЧЕБНИЦИ И В НАУЧНОИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ

1. Казаков, Л., **Н. Янев**, М. Власковска. Орофациална и дентална болка. – В: Орална медицина. (Под ред. на З. Кръстев, А. Киселова, Р. Коларов.) С., Изд. „Иван Сапунджиев”, 2009, 77–87.
2. Власковска, М., **Н. Янев**. Фармакологични основи на лечението през устата и устната лигавица. – В: Орална медицина. (Под ред.

- на З. Кръстев, А. Киселова, Р. Коларов.) С., Изд. „Иван Сапунджиев”, 2009, 108–122.
3. **Янев, Н.**, Е. Алексиев, А. Дудов. Орална онкология. – В: Орална медицина. (Под ред. на З. Кръстев, А. Киселова, Р. Коларов.) С., Изд. „Иван Сапунджиев”, 2009, 279–296.
 4. Разработване на експериментален модел на постоперативна болка и нови подходи за оптимизиране на лечението. – В проект № 39/2006 г. със СМН на МУ, София.

УЧАСТИЕ В КОНГРЕСИ И КОНФЕРЕНЦИИ

1. **Yanev, N.**, S. Surcheva, M. Vlaskovska, L. Kasakov. Studies of the analgesic and anti-inflammatory effects of the combined therapy with ibuprofen plus 18 β -glycyrrhetic acid. Abstr. II National Conference for the treatment of pain. Bansko, 24–26 June 2004, Bulgarian Association for the study and treatment of pain, Bulgarian Society of anaesthesiology, **2004**, 59.
2. **Yanev, N.**, S. Surcheva, L. Kasakov, M. Vlaskovska. Studies of the analgesic and antiinflammatory effects of the combined therapy with ibuprofen plus S-glycyrrhetic acid. – 9th Congress of the BaSS, 13–16.05.2004 г., Охрид.
3. **Yanev, N.**, S. Surcheva, M. Vlaskovska, L. Kasakov. Studies of the analgesic and anti-inflammatory effects of the combined therapy with ibuprofen plus 18 β -glycyrrhetic acid. – I Национална конференция за лечение на болката, Банско, България, 24–26.06.2004 г., abstr. 59.
4. Surcheva, S., **N. Yanev**, N. Surchev, N. Bovjanska, M. Vlaskovska. Rat model of incisional pain: possibility to study mechanism and potency of postoperative analgesia. III National Conference for treatment of pain, 29.06.–01.07.2006, Borovetz, Bulgaria, Abstr., **2006**, 42.
5. Surcheva, S. K., V. Tzvetkova, **N. S. Yanev**, N. L. Surchev, M. V. Vlaskovska, L. N. Kazakov. Benfotiamine effect on analgesic activity of cox-inhibitors: experimental studies on rat models of neuropathic allodynia, inflammatory hyperalgesia and nociceptive pain. 5th EFIC Congress, Istanbul, 13–16.09.2006, European Journal of pain, **2006**, vol. 10, Abstr. P320, **IF 3.37**.
6. Surcheva, S., **N. Yanev**, P. Kraevsky, L. Kasakov, M. Vlaskovska. Preemptive analgesia with metamisole on rats model of incisional pain.

IV International symposium of clinical pharmacology and therapeutics, Sofia, 25–26 october **2007**, P13.

7. Сурчева, Сл., **Н. Янев**, Н. Сурчев, Л. Казаков, М. Власковска. Поведение при невропатична болка и аналгетичен отговор при различни експериментални модели. Хисаря, IV Национална конференция за лечение на болката с международно участие, 19–21.06.**2008**, Сб. рез. 92.

SUMMARY

The pain is unpleasant sensory or emotional feeling connected to existing or potential tissue damage. It is always a subjective experience and its final value is defined by the localization and the characteristic of the damage, by the nature of the damaging factors, by the psychological state of the patient, by his lifetime experience, etc.

Persistence of pain could lead to adaptive changes in the nervous system structures, followed by a chronification of the pain syndrome.

Pain seizure could be achieved in 60-70 % of the clinical cases and the main causes for this control level are the complex pain mechanisms, the different types of pain, the significance of individual special features (incl.genetics), as well as the development of different adverse effects.

One of the approaches for optimization of the pain management is the mechanism based approach and also the selection of different adjuvants which could lead to reduction of the therapeutic doses and prevent some of the side effects of the commonly used medications.

The main goal of the current PhD thesis is to validate experimental models which express the different pathological mechanisms of the pain and also to examine adjuvant medications like Benfotiamine and 18 β -Glycyrrhizic acid for improving the analgesic effect of clinically significant drugs – Ibuprofen, Metamizole, Parecoxib, Morphine, Tramadol, Amitriptyline, etc.

For the different in vivo rat experiments – neuropathic pain (through chronic constriction lesion of the sciatic nerve), acute surgical pain (by means of longitudinal plantar muscle incision), acute carrageenan inflammation (through intraplantar application), chronic inflammatory pain (by means of Freund complete adjuvant arthritis) and hyperthermic reaction (using 20% brewer's yeast suspension) Wistar rats (180-200 g) were used in random groups (n = 6-12)

The nociceptive and allopathic manifestations were examined by means of the following tests – Incapacitance test, Paw pressure test, Tail flick test, Hot plate test, Plantar heat test, Von Fray aesthesiometry test and Plethysmometry test (all devices by Ugo Basile, Italy) .

Ex vivo experiments evaluating the leukocyte and the PgE2 migration levels in the inflammatory field were also conducted using carrageenan soaked sponges, subdermally implanted in the abdominal region.

The analysis of the experimental results led to the following main conclusions:

- In the neuropathic pain models, the tested analgesics show different strength, depending on the stimuli applied. The combination with Benfotiamine as an adjuvant leads to an increased strength of the NSAIDs
- In acute surgical pain, Parecoxib is more effective in mechanic hyperalgesia than in tactile allodynia. The pre-treatment with Metamizole leads to elongation of the antinociceptive effects of the different analgesics applied.
- 18 β - Glycyrrhizic acid intensifies the analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of Ibuprofen in the different models of acute and chronic inflammation. It also suppresses the invasion of leukocytes and PgE2 in the inflammatory field when used independently or in combination with Ibuprofen. So it blocks one very important mechanism of the inflammatory process which is not influenced by the solo implementation of Ibuprofen.

In conclusion we could summarize that the implementation of Benfotiamine and 18 β - Glycyrrhizic acid as an adjuvants of clinically significant analgesic drugs could reduce the risk of adverse reactions, while maintaining high anti-inflammatory and pain-killing effectiveness.



Д-р Николай Светославов Янев е роден на 5 юли 1976 г. в гр. Русе.

През 1994 г. завършва средно образование в 31-во СОУ за чужди езици и мениджмънт „Иван Вазов” в София.

От 1994 до 1996 г. отбива редовната си военна служба.

През 2002 г. завършва висше образование с магистърска степен по стоматология, СФ, МУ – София (среден успех от обучението отличен (5,67), от държавните изпити – отличен (6,00).

От 2003 до 2005 г. е ординатор в клиника по лицево-челюстна хирургия на ВМА, София.

През 2004 г. е зачислен за специализация по лицево-челюстна хирургия.

През същата година е зачислен като задочен докторант в Катедра „Фармакология и токсикология”, МФ, МУ – София.

От 2006 година и понастоящем е хирург в СБАЛ по ЛЧХ към МУ – София.

През 2010 г. придобива втора магистърска степен по медицина в МФ на МУ – София, с успех от следването отличен (5,51) и от държавните изпити отличен (6,00). Награден е с грамота за отличен успех.

През 2011 г. придобива специалност по лицево-челюстна хирургия.

Членува в: Българския лекарски съюз, Българския зъболекарски съюз, Сдружението на оралните и лицево-челюстни хирурзи в България, Европейската асоциация по черепно-челюстно-лицева хирургия, Световната асоциация по орална и лицево-челюстна хирургия, Английската медицинска асоциация (General Medical Council), а от 2010 г. е представител за България на Европейската асоциация по черепно-челюстно-лицева хирургия.

Д-р Янев има 17 научни публикации, от които 5 са свързани с дисертационния труд; има 6 участия в учебници, от които 3 са свързани с дисертационния труд; 4 участия в научноизследователски проекти, от които 1 е свързан с дисертационния труд и общо 54 участия в национални и международни конгреси и конференции, от които 7 са свързани с дисертационния труд.

Владее писмено и говоримо английски и руски езици.

Женен е, има двама сина – на 8 и на 5 години.

София, ноември 2011 г.