МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

Медицински факултет

Катедра по патофизиология

д-р Радка Кирилова Хаджиолова - Тафраджийска

ЕФЕКТИ И МЕХАНИЗМИ НА ДЕЙСТВИЕ НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ ПЕПТИДИ ОТ СЕМЕЙСТВОТО НА TYR-MIF-1 ВЪРХУ СТРЕС-ИДУЦИРАНА АНАЛГЕЗИЯ: УЧАСТИЕ НА ОПИОИДЕРГИЧНАТА И АЗОТНООКИСНАТА СИСТЕМИ

Дисертационен труд
за присъждане на образователната и научна степен "ДОКТОР"
по научната специалност патофизиология

Научни ръководители:

проф. д-р Адриана Бочева, дм

проф. д-р Анастасия Божилова, дмн

София, 2013 г

СЪДЪРЖАНИЕ

СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА _____ стр. 6
ВЪВЕДЕНИЕ _____ стр. 8
ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР _____ стр. 9

1. Ендогенни невропептиди от семейството на Tyr-MIF-1 ..... стр. 9
1.1. Ефекти и механизми на действие..... стр. 9
2. Невротрансмитери и невромодулатори..... стр. 13
3. Кръвно-мозъчна бариера..... стр. 15
3.1. Структурно-функционална същност..... стр. 15
3.2. Цереброспинална и арахноид-цереброспинална мозъчна течност – бариери в контакта на главния мозък с продуктите в кръвната циркулация..... стр. 16
3.3. Преминаване на някои невропептиди през КМБ - експериментални модели. стр. 17
3.4. Транспортни системи за опиоидни пептиди през КМБ..... стр. 19
3.4.1. Нова Na^+ – зависима транспортна система за опиоидни пептиди..... стр. 21
3.4.2. Пептидни транспортери PEPT-1 и PEPT-2..... стр. 21
3.4.3. Пептиден гликопротеин-транспортер..... стр. 21
3.5. Органични анион-транспортиращи полипептиди..... стр. 22
4. Биологични ефекти и механизми на действие на някои аминокиселини……..... стр. 23
4.1. Разрпостранение, изолиране и биосинтез..... стр. 23
4.2. Ефекти на аминокиселините върху аналгезията..... стр. 26
4.3. Ефекти на канаванина върху някои процеси в организма..... стр. 27
4.3.1.Канаванинът - селективен инхибитор на iNOS и приложението му при ендотоксинов шок…….....……. стр. 27
4.3.2. Ефекти на канаванина върху миокардната дисфункция при септичен шок.. стр. 28
4.3.3. Ефекти на канаванина при остър, некротизиращ панкреатит……..... стр. 28
4.3.4. Ефекти на канаванина върху туморния растеж.….....…… стр. 29
4.4. Цитрулин….....……. стр. 30
4.4.1. Изолиране и биосинтез на цитрулина..... стр. 30
4.4.2. Цитрулин-биомаркер при редица патологични процеси..... стр. 32
4.4.3. Цитрулин и уремия..... стр. 33
4.4.4. Други ефекти на цитрулина в организма..... стр. 34

5. Азотно-оксидни синтази (NOS)..... стр. 35
5.1. Азотна екскреция. Уреен цикъл..... стр. 35
5.2. Образуване и биологично действие на азотния оксид..... стр. 35
5.2.1. Азот-оксидни синтази, изоформи..... стр. 36
5.2.2. Източници на азотен-оксид и стимулиране на азотнооксидната продукция стр. 37
5.2.3. Инхибиране на азотнооксидната продукция..... стр. 37
5.2.4. Ефекти на азотния оксид..... стр. 37
6. Стрес-индуцирана аналгезия..... стр. 39
6.1. Еволюционно развитие и генетична основа на SIA…..... стр. 39
6.2. Модели на стрес-индуцирана аналгезия..... стр. 40
6.2.1. Безусловна SIA..... стр. 41
6.2.2. Условна SIA (FCA)..... стр. 41
6.3. Зависимост на SIA от вида на увреждащите фактори и
отрицателни стимули..... стр. 42
6.4. Полово-свързани различия при експресията на SIA…..... стр. 42
6.5. Влияние на възрастта и опита върху SIA..... стр. 43
6.6. Дифузен, инхибиращ нервните стимули контрол (DNIC)..... стр. 43
6.7. Невронални субстрати участващи в SIA..... стр. 44
6.7.1. Мозъчна кора..... стр. 45
6.7.2. Хипокамп (HC) .... стр. 45
6.7.3. Амигдала..... стр. 45
6.7.4. Periaqueductal grey (PAG) ..... стр. 46
6.7.5. Хипоталамус (HT) ..... стр. 46
6.7.6. Мозъчен ствол..... стр. 48
6.7.7. Гръбначен мозък..... стр. 48
6.8. Неврохимия на SIA..... стр. 49
6.8.1. Медиация и модулация на SIA чрез опиоидната система..... стр. 49
6.8.2. Гама-аминомаслена киселина (ГАМК) ..... стр. 51
6.8.3. Глутамат..... стр. 52
6.8.4. Моноаминергична взаимовръзка със SIA..... стр. 53
6.8.5. Роля на хипоталамо-хипофизо-надбъбречната (HPA) ос в SIA..... стр. 54
7. Участие на азотния оксид и при SIA..... стр. 54
8. Участие на опиоидната система при SIA ..... стр. 57
8.1. Мултиплени опиоидни пептиди (MOP) ..... стр. 57

8.2. Опиоидни рецептори, подвидове и техните лиганди..... стр. 58
8.3. Разпределение на опиоидните пептиди и рецептори ..... стр. 59

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ ——— стр. 62

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ ——— стр. 63
I. In vivo..... стр. 63
II. In vitro..... стр. 65

РЕЗУЛТАТИ ——— стр. 67

I. Изучаване аналгетичните ефекти на новосинтезирани аналози на Tyr-MIF-1 стр. 67
II. Изучаване аналгетичните ефекти и механизми на действие на
Tyr-Cit-MIF-1, Tyr-Cav-MIF-1 при имобилизаионна SIA……..…… стр. 72
1. Изучаване участието на опиоидергичната система в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 при имобилизационна SIA …….. стр. 72
2. Изучаване участието на вторичните посредници в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 при имобилизационна SIA…….....… стр. 77
3. Изучаване участието на азотноокисната система в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 при имобилизационна SIA .....…… стр. 78
III. Изучаване аналгетичните ефекти и механизми на действие на Tyr-Cit-MIF-1, Tyr-Cav-MIF-1 при студова SIA …….....…….. стр. 83
1. Изучаване участието на опиоидергичната система в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 върху студова SIA …..... стр. 84
2. Изучаване участието на вторичните посредници в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 върху студова SIA ..... стр. 85
3. Изучаване участието на азотноокисната система в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 върху студова SIA ..... стр. 88
IV. Изучаване аналгетичните ефекти и механизми на действие на Tyr-Cit-MIF-1, Tyr-Cav-MIF-1 върху топлинна SIA……..... стр. 91
1. Изучаване участието на опиоидергичната система в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 върху топлинна SIA…..... стр. 91
2. Изучаване участието на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 и вторичните посредници върху топлинна SIA……..... стр. 94

3. Изучаване участието на азотноокисната система в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 върху топлинна SIA ……..... стр. 94
3.1. Участие на L-NAME в аналгетичната активност на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 след едночасов топлинен стрес……..... стр. 94
3.2. Участие на SIN-1 в аналгетичната активност на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 след едночасов топлинен стрес ……..... стр. 97
V. Изучаване ефектите на невропептидите Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 върху локализацията и експресията на азотноокисната синтаза (NOS) в periaqeductal gray (PAG)…..... стр. 98

ОБСЪЖДАНЕ ——— стр. 101
ИЗВОДИ ——— стр. 111
ПРИНОСИ ——— стр. 112
БИБЛИОГРАФИЯ ——— стр. 113
СПИСЪК НА ПРОЕКТИ, ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД ——— стр. 132

СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА

АДХ	антидиуретичен хормон
АК	аминокиселини
АКТ	аортен кръвен ток
АП	акционен потенциал
АС	аргининосукцинат синтетаза
АТФ	аденозин трифосфат
БКТ	бъбречен кръвен ток
ВТО	вентротегментална област (VTA, ventral tegmental area)
ГАМК	гама-аминомаслена киселина
ГИТ	гастроинтестинален тракт
ГМК	гладко мускулни клетки (SMC, smooth muscle cell)
ГЦ	гуанилат циклаза (GC)
DAMGO	[D-Ala^2, N-MePhe^4, Gly-ol]-enkephalin
DPDPE	[D-Pen^2,D-Pen^5]-enkephalin
ЕОП	ендогенни опиоидни пептиди
ЕЦТ	екстрацелуларна течност
ИЛ	интерлевкин (IL, Interleukine)
i.p.	интраперитонеално
i.c.v.	интрацеребровентрикуларно
КА	катехоламини
КМБ	кръвномозъчна бариера
КОРТ	кортикостерон (CORT)
КОХ	кортикотропин освобождаващ хормон (CRH)
КЦСТБ	кръвна цереброспинална течност- бариера
МВ	мозъчен вентрикул
МОП	множествени опиоидни пептиди (MOP, multiple opioide peptides)
NADH	редуциран никотинамид динуклеотид
NADPH	никотинаденин динуклеотид фосфат диафораза
НМ	невромодулатори
НПАК	непротеинна аминокиселина
НПО	непептидни опиоиди

NH_3	амоняк
ОП	опиоидни пептиди
ОТК	орнитин транскарбамилаза (ornithine transcarbamilase, OTC)
ОТС	опиоидна транспортна система (OTS)
ПНС	периферна нервна система
ПОМК	пропиомеланокортин (POMC)
П/П	протеин/пептид
PDYN	продинорфин
PENK	проенкефалин
SIA	стрес-индуцирана аналгезия (stress-induced analgesia)
ТНФ	тумор-некротизиращ фактор (TNF-tumor necrosis factor)
ТС	транспортна система
ХЕК	хороидни епителни клетки
ХФ	хипофиза
ХТ	хипоталамус
HPA	хипоталамо-хипофизна ос
HIV	Human immuno-deficiency virus
CMP	цикличен монофосфат
ЦНС	централна нервна система
ЧХП	чревна хиперпропускливост

ВЪВЕДЕНИЕ

Интересът към пептидите, които са невромодулатори в ЦНС е продиктуван от изясняване участието им в редица патологични процеси, така например при някои стрес-индуцирани заболявания.

Опиоидергичните неврони и опиоидните рецептори са широко разпространени в централната и периферна нервни система, което и обуславя участието на опиоидната система в контрола на аналгезията, респираторната, кардиоваскуларната, невроендокринната секреция, моторната активност, обучение и памет, зависимост и толерантност. Ефекти на опиоидните пептиди се осъществяват чрез опиоидни рецептори μ, δ, κ, и др., които са разпространени както в централни структури, така и в периферията.

Ендогенните невропептиди от семейството на Tyr-MIF-1 се състоят от четири члена - MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1. Открити са в централната нервна система, като разпределението и специфичните им места за свързване съвпадат с разпределението на опиоидните пептиди.

В изследвания in vivo беше показано, че пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 имат изразени противоболкови ефекти, както и че повлияват стрес-индуцираната аналгезия. В антиноцицептивните ефекти на пептидите участват опиоидергичната, азотноокисна, хистаминергична и адренергичната невромедиаторни системи.

Търсенето и проучването на нови аналози на естествено биологично активните пептиди с по-висока биологична активност от тази на нативните пептиди е обект на настоящото изследване.

Бяха изучени аналгетичните ефекти на някои новосинтезирани аналози на Tyr-MIF-1, както и механизмите лежащи в основата им.

Известно е, че инкорпорирането на аминокиселини в молекулата на естествено биологично активни пептиди води до получаване на аналози с по-изразени биологични ефекти. В молекулата на Tyr-MIF-1 бяха включени аминокиселини намиращи се в мозъка на бозайниците, участващи в цикъла на уреята, а също и аминокиселините канаванин и каналин.

Получените резултати от изследванията биха имали фундаментално значение за разбирането на някои страни на пептидергичната регулация/модулация при протичането на стрес-индуцирани процеси.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Ендогенни невропептиди от семейството на Tyr-MIF-1

Ендогенната опиоидна система е важен модулатор на жизненоважни адаптационни процеси в човешкия организъм, поддържащ физиологичното равновесие в нервните и хуморални отговори посредством опиоидни и антиопиоидни пептиди (Cesselin F., 1995: Akil et al. 1972; 1976 a,b; 1984; 1986).

Ендогенните невропептиди MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 са от семейството на Tyr-MIF-1. Пептидите се отнасят към ендогенните антиопиоидни пептиди (АОР) открити в централната нервна система. Тяхното разпределение и специфичните им места за свързване съвпада с това на опиоидните рецептори. Всеки един от четирите невропептида има способността да блокира опиоидподобни ефекти.

Пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 се намират в областите, отговорни за контрола на ноцицептивното предаване (спинални или супраспинални), в контрола на емоциите, храненето, терморегулацията (Erchegui J., 1992, 1993; Hackler et al. 1995). Те се свързват с опиоидни рецептори както и със свои специфични места в мозъка.

1.1. Ефекти и механизми на действие

Tyr-MIF-1 в опити in vivo показа, че има изразен противоболков ефект (Bocheva et al., 2001). При електрическа стимулация на илеум от морско свинче се инхибират неврогенните контракции в присъствие на морфин и на опиоидния антагонист DAMGO.

В антиноцицептивните ефекти на пептидите участват азотноокисната, хистаминергичната и адренергична системи (Bocheva et al., 2001, 2003).

Tyr-MIF-1 блокира аналгезията, предизвикана от морфин, както и топлинната стрес-индуцирана аналгезия (SIA), но няма ефект върху неопиоидната SIA при плъхове. Аналгетичните ефекти при топлинна SIA са налоксон-зависими, докато при студова SIA, налоксонът няма ефект (Kavaliers M., 1987, 1988, 1990).

В друга серия от опити бе показано, че Tyr-MIF-1 редуцира аналгезията, предизвикана при интраперитонеално въвеждане на инхибитора на NO-синтазата – L-

NAME, както и аналгезията при едночасов имобилизационен стрес (Bocheva & Dzambazova – Maximova, 2004a).

Tyr-MIF-1 има антиопиоиден ефект при tail-flick-тест и hot-plate-тест. При стрес се наблюдават функционални и структурни промени в организма в резултат от сложното взаимодействие между ендокринната, имунната и ЦНС. Доказано е, че стресогенните фактори повишават нивата на опиоидите и катехоламините.

В отговор на стреса първо се покачват нивата на катехоламините, а също така той предизвиква отделяне и на опиоидни пептиди, водещи до антиноцицептивни ефекти (Inoue, 2003).

Имобилизационният стрес усилва антиноцицепцията при tail-flick (Aloisi et al, 1997, 1998), hot-plate и formaline теста (Appelbaum, 1985). Механизмите, лежащи в основата на антиноцицепцията, предизвикана от имобилизационния стрес, не са достатъчно проучени.

Изследвания показват, че налоксонът при tail-flick и hot-plate редуцира инхибирането на отговорите при имобилизационен стрес(Amir & Amit, 1978; Amit & Galina, 1986). Други автори демонстрират, че антиноцицепцията, предизвикана от имобилизационен стрес, се потенцира от опиоиди, което предполага, че поведенческите промени могат да бъдат свързани и с ендогенната опиоидна система по време на стрес (Watkins et al, 1984). При студов и топлинен стрес се увеличава антиноцицепцията при tail-flick и hot-plate тестовете (Galina, Kastin, 1987; Kavaliers M., 1988).

В мозъка на бозайниците се съдържат аминокиселини, както и всичките междинни продукти от урейния цикъл (Garthwaite, 1991). Когато ензимите, участващи в превръщането на L-ornithine в L-citrulline липсват, урейният цикъл е непълен. Откриването в мозъка на азотоксидната синтаза, катализираща образуването на L-цитрулин като ко-продукт от L-аргинина в мозъка е индикация за допълнителен път за L-Arg – метаболизъм (Bredt & Snyder; 1990; 1992).

L-аргининът също така се превръща в kyotorphin (L-tyrosyl-L-arginine)–Met-enkephalin-освобождаващ продукт. В процеса участва мозъчната киоторфин-синтаза (Ueda et al, 1995 a,b; Kawabata, 1994a,b, 1995). Известно е, че за L-Arg-метаболизм съществуват различни пътища в мозъка.

В действителност, системното въвеждане на L-Arg води до антиноцицепция в плъхове и мишки с carrageenin-индуцирана хипералгезия, но не и при интактни

животни (Kawabata et al., 1992; 1993). При хора с хронична болка L-Arg предизвиква налоксон-обратима аналгезия (Harima et al., 1991).

Антиноцицептивният ефект на L-Arg се блокира при подкожно въвеждане на naltrindole (δ-опиоидрецепторен селективен антагонист), при въвеждане i.c.v. на Leu-Arg (kyotrophin-рецепторен антагонист) или интрацистернално (i.cist.) на anti-kyotrophin serum (Kawabata et al, 1994).

L-аргининът също така е субстрат за азотокисната синтаза (NO-синтаза). Азотният оксид играе спомагателна роля в супраспиналната ноцицептивна трансмисия, докато редица инхибитори на NO-синтазата проявяват мощна антиноцицептивна активност. Ефектите им са налоксон-резистентни (Kawabata et al. 1995). Ролята на NO в мозъчната болкова перцепция е комплексна, тъй като в мозъка съществуват двете системи – проноцицептивна и антиноцицептивната.

На базата на кинетичните свойства, екзогенното прилагане на L-Arg се оказва неспособно да улесни NO-образуване в мозъка, докато мозъчната NO-синтаза не се насища от L-Arg във физиологични условия (Garthwaite, 1991). L-Arg-индуцираната антиноцицепция е медиирана от повишената продукция на NO в мозъка.

Аминокиселината орнитин (L-ornithine), приложена подкожно (s.c.) в дози 300-1000 mg/kg потиска carrageenin–индуцираната хипералгезия при плъхове по налоксон-обратим начин. Когато L-ornithine и L-arginine се въвеждат в мозъчните вентрикули в доза 10-100 mg/мишка предизвикват антиноцицепция в интактни мишки. Този ефект се премахва от naloxone или naltrindole, но се потенциира от bestatin (инхибитор на аминопептидазата и киоторфиназата).

Антиноцицепцията, индуцирана чрез въвеждане на L-ornithine (i.c.v.) се инхибира от L-Leucyn-L-arginine (kyotrophin-рецепторен антагонист, i.c.v.), докато i.cist. въвеждане на anti-kyotrophin serum няма ефект.

L-Tyrosyl-L-ornithine, синтетичен дипептид, въведен в доза 1-10 mg, (i.c.v.) предизвиква kyotorphin-подобна антиноцицепция посредством киоторфинови рецептори (Kawabata et al, 1995). Следователно, L-ornithine имитира аналгетичните свойства на L-Arg, най-вероятно по пътя на образуването на Tyr-Orn (антиноцицептивен дипептид).

Литературните данни показват, че L-canavanine, L-arginine, L-ornitine и L-citrulline притежават аналгетичните ефекти при тестове, въвличащи механо- и терморецепторите, докато L-canaline реверсира болковата реакция до хипералгезия (Kawabata et al;1994; Bocheva & Dzambazova- Maximova, 2004a).

Включването на аминокиселини в молекулата на естествено биологично активни пептиди води до получаване на аналози с биологична активност.

Канаванинът е природна аминокиселина, структурен аналог-антиметаболит на аргинина. Антиметаболитните свойства на канаванина се потвърждават от включването му в редица етапи от аргининовия антиметаболизъм.

Орнитинът е метаболит на аргинина и предизвиква аналгезия чрез рецепторите на киоторфина (Kawabata, 1994). Включването на L-canavanine в молекулата на късоверижните пептиди киоторфин и MIF-1 води до статистически достоверно потенциране на аналгетичните ефекти на пептидите, които са налоксон-обратими. Тези получени резултати бяха базата за изучаване на новосинтезирани аналози на Tyr-MIF-1 (Bocheva & Dzambazova – Maximova, 2003).

Литературни данни показват, че естественият невропептид Tyr-MIF-1 антагонизира аналгетичните ефекти на морфина и L-NAME, блокира аналгезията при топлинната SIA, но няма ефект върху неопиоидната SIA при плъхове (Kastin, 1985). Аналгетичните ефекти при топлинна SIA са налоксон-зависими, докато при студова SIA налоксонът няма ефект (Kavaliers M., 1987; 1988).

Известно е, че пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 притежават както опиоидоподобни, така и антиопиоидни свойства. В изследвания *in vivo* бе показано, че пептидите имат изразени противоболкови ефекти (Bocheva A. et al., 2001a; Brakadanska et al., 2001). В техния механизъм са въвлечени азотноокисната, хистаминергична и адренергичната системи (Bocheva A. et al., 2003, 2004).

Литературните данни показват, че характерно за антиопиоидното действие на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 е да потискат морфиновата аналгезия, както и някои форми на аналгезия, провокирана от стрес (Kastin et al., 1979; Cesselin F., 1995; Bocheva&Dzambazova-Maximova, 2004). Те понижават толерантността към леворфанол, провокират синдром на абстиненция при мишки със зависимост към морфин (Kastin et al., 1979; Cesselin F., 1995).

Доказано е, че пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 редуцират острата морфинова аналгезия, аналгезията, предизвикана при интраперитонеалното въвеждане на инхибитора на NO-синтазата - L-NAME, както и аналгезията при едночасов имобилизационен стрес (Bocheva et al., 2004).

Азотният оксид (NO) е тясно свързан със стрес-индуцирани заболявания и този факт е в основата на интензивните проучвания за участието му при различни видове стрес (Esch et al., 2002).

Литературните данни показват, че пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 антагонизират аналгетичните ефекти на морфина и L-NAME. Наред с това в ефектите и механизмите на пептидите при стрес-индуцираната аналгезия са въвлечени азотноокисната и адренергична невротрансмитерни системи (Bocheva A. et al., 2004).

Задълбоченото изследване механизмите на модулиращото действие на опиоидните пептиди би създало предпоставки за по-ефективно повлияване на редица важни медико-социални проблеми свързани със стрес-индуцираните заболявания, физическото и психическото изтощение и др.

Известно е, че азотноокисната система има участие в механизмите на болката, паметта и обучението и др. Тези изводи се основават на хистохимични данни, че NO-синтаза се открива в неврони в главния мозък, в лонгитудиналните дорзолатерални стълбове в средния мозък у плъхове, т.е. области имащи отношение към болковата модулация (Moncada, 1992). .

Всичко това подсказва необходимостта от изучаване аналгетичните ефектите на новосинтезираните аналози на Tyr-MIF-1 в норма и при стрес-индуцирана аналгезия, както и да се проучи дали в аналгетичните им ефекти са въвлечени опиоидергичната и азотноокисната системи.

2. Невротрансмитери и невромодулатори

Известно е, че процесът на невротрансмисия включва: синтез, складиране, освобождаване на невротрансмитера, както и реакцията на невротрансмитера със съответния рецептор и определяне на рецепторното действие (von Bohlen und Holbach., 2007).

Нервната и ендокринна системи използват химични молекули като посредници. Редица неврони като тези на адреналната медула секретират трансмитери в кръвната циркулация, а също така е известно, че други неврони притежават рецепторни участъци за хормони. Някои от хормоните в даден момент се оказват и невромодулатори. Такъв например е вазопресинът (Wotjak et al., 1998, Holmes et al., 1986).

Невротрансмитерите се синтезират в цитоплазмата на аксон-терминалите. Тяхната синтеза може да изисква една или повече ензим-катализиращи стъпки (например една за ацетилхолина и три за норадреналина). След синтезирането им невротрансмитерните молекули се складират в синаптични везикули на аксон-терминалите. Хиляди такива могат да присъстват в един терминал, всеки един от тях

може да съдържа 10 - 100 000 трансмитерни молекули. При получаване на импулс до нервните окончания се придвижват везикулите от клетъчната мембрана и следва освобождаване на техните трансмитерни молекули в синаптичните пространства (Власковска и сътр., 1989).

Невротрансмитерите реализират своя ефект след свързването им със специфични рецептори. Във всички случаи взаимодействието *трансмитер-рецептор* има за резултат специфичен физиологичен или патофизиологичен процес или отговор.

Към невропептидите принадлежат субстанция Р, ендорфините и енкефалините, които имат място в патогенезата на болковата перцепция.

Известно е, че един от важните защитни механизми на организма, в частност на ЦНС, е способността на кръвно-мозъчната бариера да не пропуска циркулиращите аминокиселини и други молекули с потенциална невротрансмитерна активност.

Независимо от резултатите за общата характеристика, структура, физиологични и др. ефекти на аминокиселините и пептидите има още какво да се очаква в тази насока и особено за ролята на пептидите като невротрансмитери.

Някои аминокиселини например - глутаминовата, притежава мощен стимулиращ ефект върху синаптичната трансмисия, докато глицеринът е с доказан инхибиращ ефект. Друг известен инхибиращ трансмитер е гама-амино-маслената аминокиселина (ГАМК), която се синтезира в мозъка и в гръбначния мозък. Повече от една трета от синапсите използват ГАМК (von Bohlen und Holbach, 2007).

В светлината на съвременните познания за невротрансмитерите (НТ) се оказва, че една и съща аминокиселина може да функционира като НТ и като основна градивна единица за протеинова синтеза.

Действията на невротрансмитерите са локализирани в група неврони с аксон-проектиращ ефект във високо специализирани области на главния мозък. С разширяване на познанията относно невротртноансмитерите, някои заболявания се свързват с алтерация във функцията и ефектите на различните НТ (болест на Паркинсон, Алцхаймер, шизофрения др).

Друг клас молекули-посредници, известни като невромодулатори също могат да се освобождават от аксон-окончанията и да взаимодействат с пре- или постсинаптичните рецептори, предизвиквайки освобождаване на невротрансмитери или на отговор спрямо тях. Невромодулаторите реагират с мембранните рецептори, което води до възбуждане или потискане на съответни реакции. Невротрансмитерите

принципно могат да променят и да въздействат върху посоката и скоростта на тези реакции.

Невропептидите могат да изпълняват ролята и на невромедиатори, действайки на принципа на невротрансмитерите. Важно е да се отбележи, че съществуват някои основни разлики между класическите невротрансмитери и невропептидите, за които е характерно: не се захващат обратно от нервните окончания, а се подлагат на ензимно разграждане; синтезират се в перикариона, обикновено като големи прохормони, които се складират и транспортират по протежението на аксона до нервните окончания; локализирани са в различни типове вакуоли; освобождават се в активна форма само при високочестотни импулсими и имат по-продължителен ефект, който е от 30 мин. до 2 часа, дължащ се на продукти от метаболизма (Власковска и сътр., 1989).

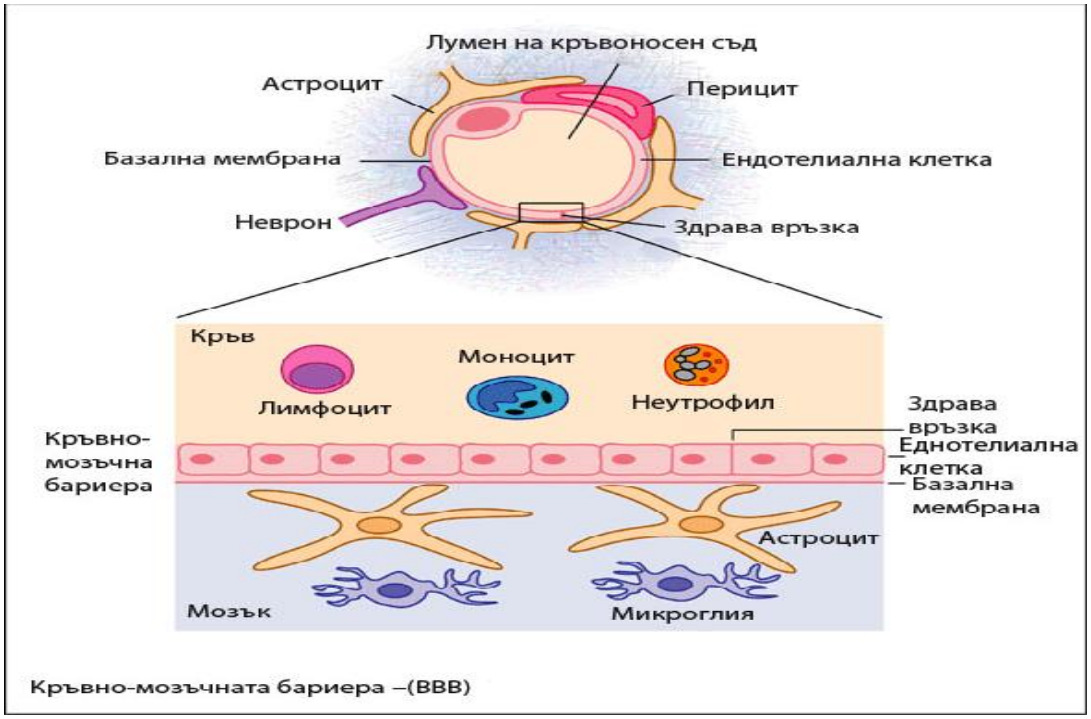
3. Кръвно-мозъчна бариера

3.1. Структурно-функционална същност

Поддържането на постоянния химичен баланс на околната среда за мозъка се оказва есенциално условие за нормалното му функциониране. Екстрацелуларната течност (ЕЦТ) претърпява малки отклонения по отношение на pH, концентрациите на хормоните, аминокиселините ($АК_{(и)}$), Na^+ - и K^+ - йони по време на рутинни ежедневни дейности (хранене, сън, физическо и умствено натоварване). Но ако мозъкът бъде подложен на значителни отклонения, то резултата би бил една неконтролируема нервна активност. Някои субстанции $АК_{(и)}$, действащи като НТ, йони (K^+) ще променят прага на нервната възбуденост, както и акционния потенциал, което в крайна сметка би довело до непредвидими реакции и последици.

Кръвно-мозъчната бариера (КМБ) и цереброспиналната мозъчна течност (ЦСТ) оказват незаменими *„охранителни”* функции в запазване стабилността и постоянството на околната химична среда на главния мозък.

Кръвно-мозъчната бариера зависи от уникалната структура и характеристика на мозъчните капиляри, чиито ендотелни клетки са свързани в поредица от здрави, стабилни връзки (Фиг 1.).



Фиг. 1. Кръвно-мозъчна бариера

3.2. Цереброспинална и арахноид-цереброспинална мозъчна течности – бариери в контакта на главния мозък с продуктите в кръвната циркулация

Епендималните клетки, тапициращи хороидния плексус са свързани помежду си чрез здрави връзки, като формират комплекса кръвно-цереброспинална мозъчна течност - бариера. Водата се транспортира през хороидални епителни клетки (ХЕК) чрез осмоза; O_2 и CO_2 - чрез дифузия. Тези клетки използват енергия под формата на АТФ за активната секреция на редица компоненти към цереброспиналната мозъчна течност.

Съществуват механизми, които не изискват енергийни ресурси за транспортиране на някои молекули. Такава *„привилегия”* има глюкозата. Амонякът, който е токсичен продукт на невронална активност се превръща от астроцитите в глутамин. Той с улеснена дифузия напуска хороиден епител (ХЕ) към плазмата. Подобни механизми съществуват и за други токсични метаболити.

Поради факта, че главният и гръбначният мозък не притежават лимфни канали, цереброспинална мозъчна течност изпълнява и тази функция. Някои специфични зони в мозъка нямат кръвна цереброспинална течност - бариера (КЦСТБ).

Една от тях е в каудалния край на IV^{ти} вентрикул (area postrema), в която има специализирани рецептори за CO_2 в цереброспиналната мозъчна течност. Друга такава зона включва стените на III^{тия} мозъчен вентрикул, регулиращ състоянието на глад и ситост. Голяма част от клетките на III^{ти} мозъчен вентрикул са епендимни клетки, но една част от тях са модифицирани (таницити или перицити - от гръцка дума за „stretched out" клетки – „разтягащи се"). Тяхната функция не е цялостно изяснена. Най-вероятно транспортират хормони от цереброспиналната мозъчна течност към хипофизата или от хипоталамусните неврони към цереброспиналната мозъчна течност. Освен това те осигуряват допълнителна бариера между цереброспиналната мозъчна течност и мозъка (Фиг. 1). Възможно е таницитите да играят не само бариерна, но и невроендокринна функция. Има доказателства, че тези клетки участват и в регулацията на пролиферацията, продължителност на живот, миграция, диференциация на ендотелните клетки (Hynynen et al., 2003, 2005).

3.3. Преминаване на някои невропептиди през кръвно-мозъчната бариера – експериментални модели

Повечето от пептидите не са изучени подробно, тъй като някои не преминават кръвно-мозъчната бариера (КМБ) и техните рецептори не могат да взаимодействат с мозъчните структури. Така например при опитни мишки въведен L-serinyl β-D-glucoside (аналог на met-enkephalin, i.p.) се транспортира през КМБ и посредством μ и δ-опиоидни рецептори се свързва със структури в мозъка им (Polt et al. 1992; 1994). Оказва се, че глюкозилирането намалява липофилността на пептидите при транспорта им през липофилния ендотелен слой на мозъчните съдове. Това подсказва, че глюкозния транспортер GLUT-1 е отговорен за пренасянето на белтъчния фактор.

Човешкия мозък и неговите функции се регулират от широк набор пептидни невромодулатор/и/, които се секретирани от невроните. Лекарствените процедури базирани върху тези натурални пептиди посредници и техните рецептори в мозъка са били и продължават да са обект на интензивни изследвания. Прилагането им обаче като фармакотерапевтични средства често е лимитирано от КМБ, която изключва голяма част от пептидите и попадането им в мозъка (Bodor et al. 2000; 2002; 2003; Gabathuler, 2009).

Ендогените невропептиди в мозъка, както и техните аналози участват в редица неврологични функции, както и при болестта на Алцхаймер и др. Ето защо те са изучавани с оглед възможността им да преминават КМБ (Ahlin et al. 2002; Alyaudin et al., 1995; 2001; Chishty et al., 2004; Cho et al., 2002: Rappoport et al. 2000; Hynynen et al, 2003; 2005). Използван е метод на свързване на даден пептид с моноклонално антитяло срещу трансферин-рецептор. Показано е, че този конюгат преминава КМБ и предизвиква централни ефекти. Прилагана е и т.н. „*lipophilic prodrug*" стратегия, при която липофилността на пептида е усилена чрез мастно разтворими субституенти, които с помощта на ензимно разграждане да бъдат „изчистени" и отстранени от мозъка. Този подход не е особено приложим и препоръчителен, тъй като понижава тяхната разтворимост в серума.

Рецептор-медиирания транспорт е доказан за невропептида Tyr-W-MIF-1, за инсулина и трансферина при което ковалентното се захващат не-транспортабилните пептиди към тези транспортни вектори. Някои полярни метаболити, които са необходими за мозъка активно се транспортират чрез рецептор-медиирана ендоцитоза или градиент-следваща котранспортна система.

При бозайниците β-D-глюкозата се транспортира бързо в мозъчната тъкан чрез глюкоза-транспортери (GLUT-1), намиращи се в мембраните на ендотелните клетки в мозъка, изграждащи КМБ (Zhang et al., 2005; 2006).

Lac-пермеазата, H^+- β-галактозид ко-транспортер и SGLT-1 (интестинален Na^+-D-глюкоза-ко-транспортер са открити в Escherichia coli. Всичките пренасят β-гликозиди, но по-слабо техните субстрати-β-D-лактоза и β-D-глюкоза (Banks, 1999).

Отчитайки структурна близост на GLUT-1 с тези трнспортери логично е да се допусне, че тези транспортни системи биха транспортирали също така биологично активни пептиди в мозъка, ако пептидите са свързани с β-D-глюкозата. Глюкозния транспортер се оказва специфичен за β-O-свързани гликозиди, но не и за α-, нито за N-свързаните и O-acyl-свързания енкефалин, конюгирани с глюкозата. Те не притежават способността за преминаване през КМБ.

Два hydroxyproline-свързани гликопептид-енкефалинови аналози Tyr-D-Met-Gly-Phe-Hyp (β-Gal)-amide и Tyr-D-Met-Gly-Phe-Hyp (β-Gle)-amide са изследвани за антиноцицептивна активност при плъхове. При (i.c.v.) въвеждане на веществото, галактозидът се оказва над 1700 пъти по-мощен от глюкозата, докато самият глюкозид е със значителна активност извън ЦНС. Авторите предполагат, че

дифузията е отговорна за различията в мощността на ефектите на веществата. Дифузията на гликозидите е улеснена от глюкозния транспортер.

Морфинът, едно от най-старите лекарства в модерната фармакопея може също да бъде транспортиран във физиологично активна форма, като 6-glucuronide-A през КМБ. Morphine-6-glucuronide-A, се оказва 10-15 пъти по-мощен от самия морфин по отношение на аналгезията. β-D-glucuronide A и B на морфина се образуват in vivo, чрез ензимни процеси в черния дроб.

Ендогенните енкефалини не преминават КМБ и се разграждат бързо от пептидази при попаданета им в общия кръвен ток. За разлика от тях мощния синтетичен δ-опиоиден агонист DPDPE е стабилен аналог, устойчив на ензимно разграждане със значителна способност за пенетрация през КМБ, притежаващ аналгетичен ефект.

Изследванията на Polt et al. (1994) показват, че β-D-глюкозилирани опиоид-агонисти, въведени периферно предизвикват аналгезия след преминаване на КМБ. Пептидите трябва да попаднат в общото кръвообръщение от мястото на въвеждането им преди да навлязат в мозъчните капиляри. Тази миграция е улеснена, благодарение високата водна разтворимост на гликопептидите транспортери. Енкефалиновите аналози се оказват не само метаболитно стабилни за продължителен период от време in vivo, но и чрез способността си да преминават КМБ и да предизвикват продължителна аналгезия.

3.4. Транспортни системи за опиоидни пептиди през кръвно-мозъчна бариера

Трансмембранният транспорт за ендогенни и синтетични опиоидни пептиди е от значение за фармакокинетиката и биологичната им ефективност. Процесът на транспортиране повлиява дистрибуцията на опиоидни пептиди през кръвно-мозъчна бариера и тяхната елиминация.

Болшинството от транспортните системи, разпознаващи опиоидни пептиди като субстрати са добре охарактеризирани на функционално ниво, както и ефектите им в различните зони на човешкото тяло. Част от тези системи са идентифицирани и на молекулярно ниво. Те включват H^+-съдържащи пептиди транспортери PEPT-1 и PEPT-2, АТФ-зависим ефлукс-транспортер P-гликопротеин и резистентния на

множество лекарства протеин P-2, както и някои представители на генното семейство на органични анион-транспортиращи полипептиди.

Опиоидните пептиди играят важна роля при редица биологични процеси, включващи аналгезия, дишане, обстипация, еуфория, тревожност, спокойствие и др. Известни са четири класа ендогенни опиоидни пептиди: енкефалини, ендоморфини, динорфини и ендорфини. Тези пептиди са открити в мозъка и гастроинтестиналния тракт и се образуват от различни прекурсори.

Биологичният ефект на ендогенно образуваните и екзогенно въведени опиоидни пептиди, зависи от редица фактори: плазмен полуживот, успешното им навлизане в таргетните им зони. Водещи фактори при тези процеси е преминаването на опиоидните пептиди през кръвно-мозъчна бариера (КМБ) и през клетъчната плазмена мембрана. Транспортирането на пептидите през кръвно-мозъчна бариера до мозъка е важен момент за биологичната им ефективност. Не без значение е факта, че ендогенните опиоидни пептиди, екзогенните и техните деривати проявяват подчертана хидрофилност, което затруднява преодоляването на хидрофобната мембранна структура по пътя на една дифузия.

Редица специфични транспортни системи са изучени в различни тъкани и клетки, подпомагащи преминаването на опиоидните пептиди през плазмената мембрана. И така, както бе отбелязано преминаването на разтворимите вещества през КМБ може да се осъществи в посока от кръвта към мозъка или обратно. Съществуват доказателства за преминаване и в двете посоки. До този момент са описани четири пептидни транспортни системи за трансфер през кръвно-мозъчната бариера: PTS-1, PTS-2, PTS-3 и PTS-4.

За PTS-1 системата е известна, че тя само разпознава опиоидните пептиди като субстрати. Известно е, че субстратите на PTS-1 включват: Tyr-MIF-1 (Tyr-Pro-Leu-Gly-NH_2), Met-enkephalin, Leu-enkephalin, β-cosomorphin (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-ile) и dynorphin 1-8. Относно опиоидните пептиди kyotorphin и dermorphin (Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH_2) трябва да се подчертае, че те не се отнасят към субстратите за PTS-1. Хидрофобната аминокиселна левцин е алостеричен регулатор на тази система. PTS-1 вероятно е локализирана в капилярните ендотелни клетки на мозъка и улеснява дифузията на тези субстрати чрез трансмембранен, енергонезависещ транспорт в двете посоки.

Невропептидите endomorphin-1 и endomorphin-2 преминават КМБ чрез система, която е различна от PTS-1. Синтетичните опиоидните пептиди DAMGO и DPDPE не взаимодействат с тази транспортна система.

За deltorphin I (Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH_2) и deltorphin II (Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH_2) специфичните транспортни системи са други, които използват мозъчните микросъдове. Съществува и транспортна система частично зависима от Na^+. За нея е известно, че тя не взаимодейства с енкефалините, DAMGO или DPDE. Интересен е фактът, че Naloxone, но не и Naltrindol се конкурира с делторфините за транспортиране чрез тази система.

3.4.1. Нова Na^+-зависима транспортна система за опиоидни пептиди

В последно време бе открита и поддържана човешка линия, ретинална пигментна клетъчна линия (ARPE-19), при която е налице Na^+-свързана активна транспортна система, специфична за опиоидните пептиди. Тя приема различни опиоидни пептиди, съдържащи от 4-13 аминокиселини. Субстратите за тази транспортна система включват енкефалин, както и някои негови деривати и синтетичния опиоиден пептид deltorphin II. Новооткритата опиоидна транспортна система (OTS) е специфична за пептиди и не взаимодейства с антагонисти (naloxone и naltrexone). Интересен е факта, че експресията на тази транспортна система в ARPE – 19 клетки е значително изразена чрез Tat-протеин, закодиран в генома на HIV-1.

3.4.2. Пептидни транспортери PEPT-1 и PEPT-2

PEPT-1 и PEPT-2 представляват H^+-свързани транспортери за кратки пептиди, съставени от 2 или 3 аминокиселини. PEPT-1 е доказан за първи път в интестиналната тъкан, докато PEPT-2 е в различни тъкани, включително и в мозъка. PEPT-1 е успешна транспортна система за перорално приети синтетични опиоидни пептиди с терапевтична цел, докато PEPT-2 е транспортер за киоторфина.

3.4.3. Пептиден гликопротеин (P-GP) – транспортер

Пептидният гликопротеин (P-GP) е транспортер, кодиран от ген отговорен за мултилекарствена резистентност – MDR1. Той е един АТФ-зависим транспортер и

енергията, освободена при хидролизата на АТФ се включва за активиране ефлукса на субстратите от клетките. Широк е обхвата на субстратите, специфични за P-GP, включващ редица пептиди. Този ефлукс-транспортер е експресиран върху луминалната страна на ендотелните клетки, в състава на кръвно-мозъчна бариера. Има доказателства, че този транспортер пренася опиоидни пептиди през кръвно-мозъчна бариера в посока мозък - кръв. Морфинът и asimadoline преминават кръвно-мозъчна бариера с помощта на този транспортер. Експериментално са доказани интересни факти, засягащи P-GP за различни биологични видове.

Knockout-мишките не притежават единият или нито една от двете изоформи на P-GP. Гризачите имат 2 гена, докато при човека е известен само 1 ген за този протеин. Това предполага и обяснява факта, че при тези мишки в мозъка им се акумулират повече опиоиди, сравнено с контролните мишки след i.v. инжектиране. Те значително повишават чувствителността си към опиоид-индуцираната аналгезия. От друга страна, транспортирането в посока мозък - кръв на ендогенните и синтетичните опиоидните пептиди се нарушава, когато P-GP е инхибиран от потисната регулация или е изтощен като транспортер. Този факт подсказва, че тези опиоидни пептиди са субстрати за ефлукс-транспортерите (Kastin et al, 2002).

Изследванията относно транспортните функции или стимулирането на P-GP-асоциирана АТФ-азна активност, доказват, че DAMGO се транспортира чрез P-GP.

Съществуват и противоречиви данни за ролята на P-GP при транспортирането на ендоморфините през кръвно-мозъчна бариера. Използването на DAMGO като транспортен субстрат за P-GP покаа, че endorphin-1 и endorphin-2 се конкурират с DAMGO при транспортния процес. Независимо от това при директно измерване на мозъчно-кръвния ефлукс на ендоморфини не е категоричното доказано ангажирането на P-GP в ефлукс-процеса. Тези резултати доказват, че ендорфините функционират като инхибитори на P-GP, но не и като транспортни субстрати.

Енкефалините не взаимодействат с P-GP. Възможно е специфични структурни свойства, характерни за опиоидните пептиди да определят взаимодействията на P-GP.

3.5. Органични анион-транспортиращи полипептиди

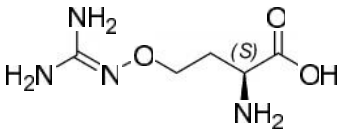
Органични анион-транспортиращи полипептиди (OATPs) принадлежат към голяма генна фамилия, доскоро наброяваща 36 представители. Тези транспортери медиират трансмембранния трансфер на анионни субстрати на различни химични

структури. Техният транспортен механизъм включва електронеутрален анионен обмен. Органичните анион-транспортиращи полипептиди функционират като двупосочни транспортери.

4. Биологични ефекти и механизми на действие на някои аминокиелини

4.1.Разпространение, изолиране и биосинтез.

Канаванинът (Cav)–2-amino-4(guanidinooxy)butanoic acid) е природна аминокиселина от растителен произход, структурен аналог и ефективен антиметаболит на аргинина, в молекулата на който последната метиленова група във веригата е заменена с кислороден атом (Фиг. 2). Антиметаболитните свойства на канаванина се потвърждават от включването му в редица етапи от аргининовия антиметаболизъм.



Фиг. 2. Канаванин-химична формула

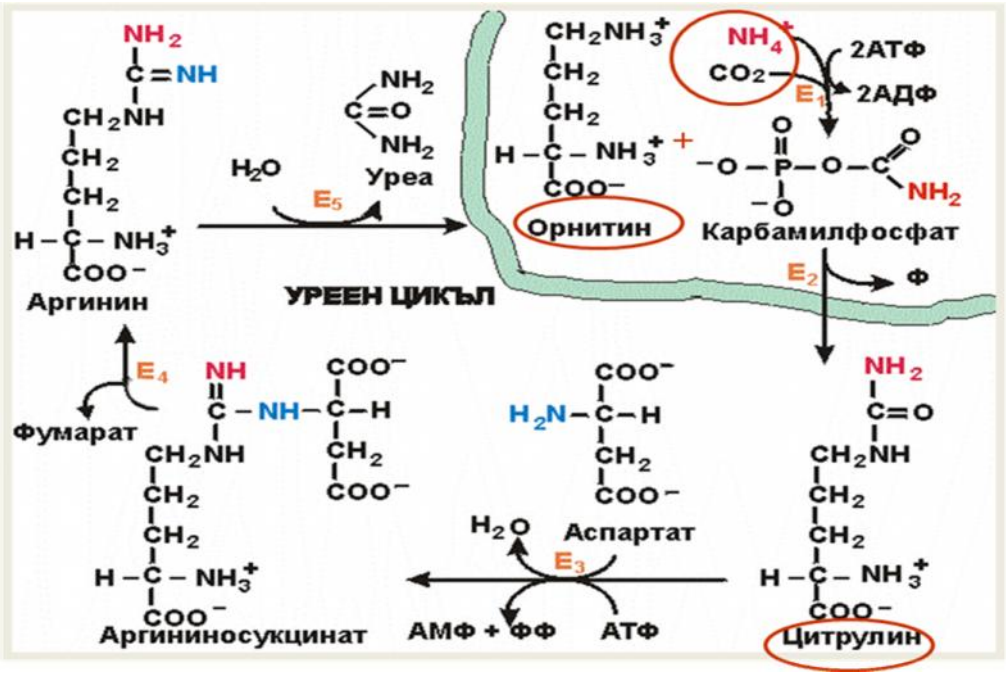
Той е изолиран от семената на Canavalia ensiformis – високостеблено, южноамериканско растение от семейство бобовите култури чрез многократна екстракция с ацетон (Rosenthal et al, 1975). Намира се в естествен вид в над 350 вида от кълнове на редица други растения: люцерна, боб, бакла и др. зеленчуци, както и в хранителни съставки. Най-висока концентрация на Cav (13% сухо тегло) се съдържа в Dioclea megacarpa и над 5% в семената на Canavallia ensiformis. Канаванинът първоначално се акумулира в семената на тези растения. Той има двустранна роля за развитието им: *защитна*, като природен пестицид, както и *витален източник* на азот за зародишите.

Организмите консумиращи съответните растения могат погрешно да инкорпорират в своите собствени протеини Cav на мястото на Arg и по този начин да продуцират структурно аберантни протеини с променени вследствие на това функции. Бръмбарите *Caryedes brasiliensis* са способни да консумират без проблем семената, като модифицират arginine-tRNA-synthetase и по този начин използват

канаванина за източник на азот. Той от своя страна е необходим за синтез на аминокиселини.

Канаванинът измества аргинина от неговия метаболитен цикъл (цикъла на орнитин-карбамида) и под действието на ензима аргиназа се хидролизира до каналин и карбамид, цикъл на каналин-карбамида (Rosenthal et al., 1973) (Фиг 3).

Канаванинът притежава мощни антиметаболитни способности в различни организми, вариращи от вируси и прокариоти до бозайници. Действието му е преди всичко като антагонист на L-arginine.



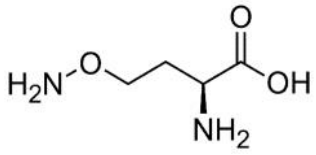
Фиг. 3. Уреен цикъл

Канаванинът е способен да се инкорпорира в клетъчните ядра и да повлиява образуването на ДНК и РНК. При маймуни причинява някои хематологични и серологични аномалии, които наподобяват тези при хора със системни и автоимунни заболявания, засягащи кожата и бъбреците (като lupus erythematosous).

Канаванинът нарушава мембранната повърхност на В-клетките, което подсказва участието му в патологичен имунен отговор (Rosenthal et al, 1977). Началните изследвания са свързани с ефектите му върху дейността на ЦНС. Инжектиране на *каналин и канаванин* индуцира продължителна моторна двигателна активност при възрастни представители на тютюневите хоботчести червеи - *Manduca sexta(L.)*.

Резултатите показват, че канаванинът нарушава активността на ЦНС при *M. sexta* по неизвестен механизъм (Dahlman, 1975).

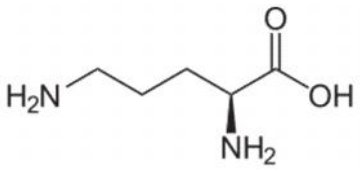
Каналинът (α-аминокиселина) (Can) е структурен аналог на орнитина и е четирикратно по-токсичен от канаванина (Rosenthal et al, 1973). Той като метаболитен дериват на канаванина получен посредством аргиназа-медиирана хидролиза привлича вниманието на изследователите (Фиг. 4).



Фиг. 4. Каналин-химична формула

Каналинът вероятно е биологично активния фактор. Той не повлиява аксоналната проводимост на акционния потенциал, нито активността на механо-рецепторите по предните крилца. Доза 22 μmol/g живо тегло удължава постсинаптичния потенциал на летателните мускулни фибри, но след 20-40 min тяхната електрична активност е нормализирана. Първоначално молците летят нормално, но след време в зависимост от дозата те стават дезориентирани и с намалена мускулна активност**.** Каналинът предизвиква инициалния ефект 12-13 min след инжектирането, докато този на канаванина, настъпва след около 1-2 часа.

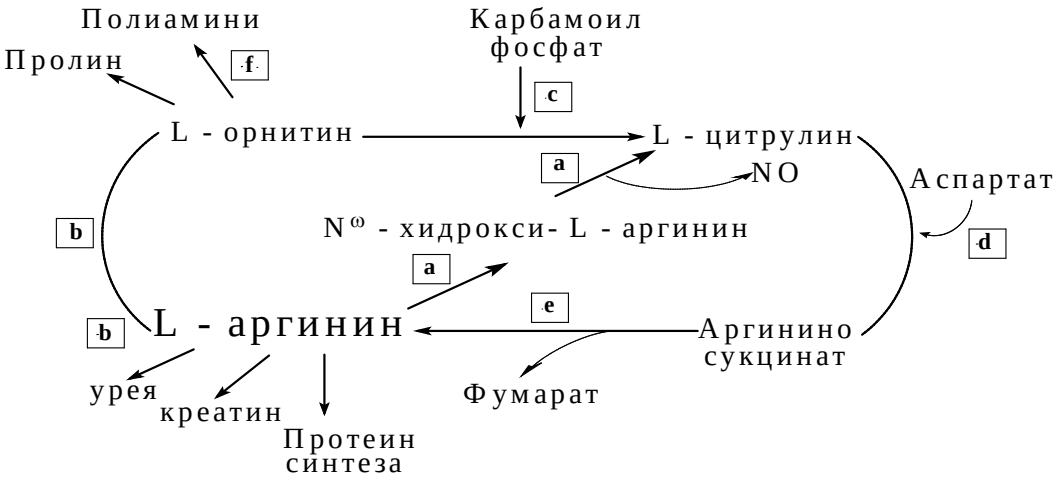
Каналинът би могъл да влияе на ЦНС, като блокира действието на инхибиращите трансмитери, като ГАМК (Rosenthal et al, 1973).



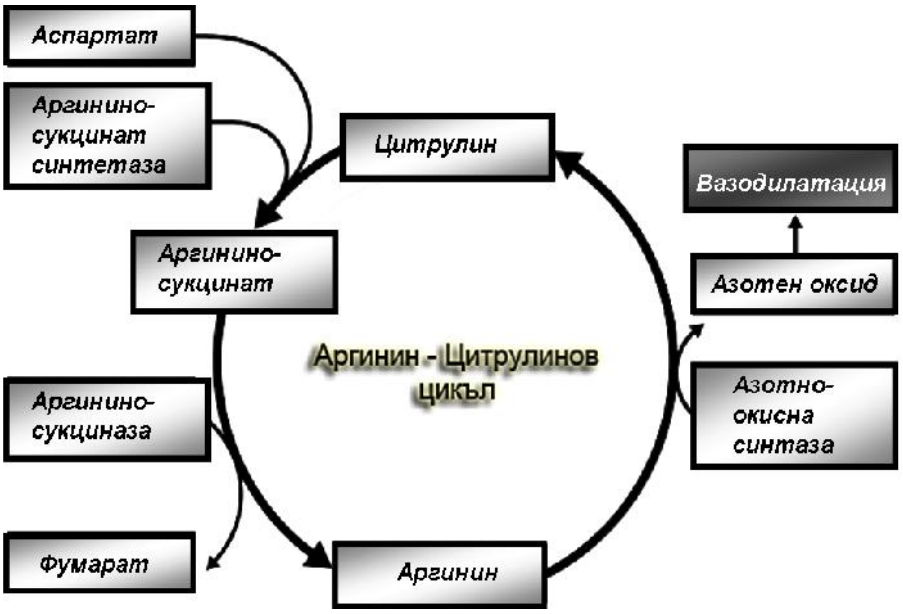
Фиг. 5. Орнитин-химична формула

Орнитинът (Orn) е метаболит на аргинина. Предизвиква аналгезия чрез рецептори на киоторфина (Kawabata A., 1994a) (Фиг. 5).

L-цитрулинът може да се превърне отново в L-аргинин след включване в молекулата му на един азотен атом (Фиг. 6 и Фиг. 7).



Фиг. 6. Метаболитни пътища и ензими, свързани с метаболизма на L-аргинина.
Ензими: a – NOS; b – аргиназа; c – орнитин карбамил-трансфераза; d – аргининосукцинат синтаза; e - аргининосукцинат лиаза; f – орнитиндекарбоксилаза



Фиг. 7. Цикъл аргинин-цитрулин

4.2. Ефекти на аминокиселините върху аналгезията

В опити с въвличане на механо- и терморецепторите е изучена аналгетичната активност на амнокиселините L-canavanine, L-arginine, L-ornitine, L-citrulline и L-canaline. Изследваните аминокиселини притежават изразени аналгетични ефекти, с изключение на L-canaline, който реверсира болковата реакция до хипералгезия (Kawabata A., 1994; Bocheva et al, 2004a).

Инкорпорирането на L-canavanine в молекулата на късоверижните пептиди киотрофин и MIF-1 води до статистически достоверно потенциране на аналгетичните им ефекти, които са налоксон-обратими (Bocheva et al, 2004a; Boyanov et al, 2005).

4.3. Ефекти на канаванина върху някои процеси в организма

4.3.1. Канаванинът - селективен инхибитор на iNOS и приложението му при ендотоксинов шок

При човека септичният шок се манифестира със следните симптоми намалена периферна резистентност, ниско артериално налягане, увеличена съдова и пулмонална пропускливост, както и тази на чревната мукоза (ЧХП).

При експериментален модел на ендотоксинов шок у плъхове освен класическия норадреналин (НА) и антидиуретичен хормон (АДХ) е въведен и канаванин. Тъй като той е инхибитор на iNOS, то целта е била да се проследи повлиява ли хемодинамичните показатели при диструбутивен шок (Lee et al, 2001; Levy et al, 2004; Mansart et al., 2006).

И трите изследвани вещества повишават средното артериално налягане, понижават аортния кръвен ток, но не променят бъбречния кръвен ток (Lee et al, 2001; Levy et al, 2004). Приложените субстанции възстановят средно артериална налягане към базалните стойности, но незначително възстановяват аортния, абдоминалния, ренален и мезентериален кръвоток.

Норадреналинът намалява чревната хиперпропускливост, повишава пропускливостта на белодробните капиляри, повишава АН, но не променя бъбречния лактат и АТФ. Високите дози повишават O_2-консумация.

АДХ също понижава чревната хиперпропускливост, оказва мощен вазоконстриктивен ефект, посредством V_1-рецепторна стимулация – повишава АН, намалява бъбречния лактат, нормализира АТФ, подобрява системната хемодинамика без странични ефекти и частично подобрява бъбречните функции при V_1-R-артериоларна вазоконстрикция и V_2-R-общ антидиуретичен ефект.

Ефектите на канаваниан наподобяват тези на АДХ. Повишава АН без да повлиява значително бъбречните функции в условията на септичния шок т.е. той се явява като селективен инхибитор на iNOS. За него е известно, че потиска NO-

ендотелната синтаза, стимулира гломерулната филтрация, не променя циркулацията и съдовата пропускливост в спланхниковата област и в малкия кръг на кръвообръщението. Тези резултати подсказват евентуалното му приложението при остра бъбречна и дихателна недостатъчност, съпътстващи ендотоксемията. Ефектите на норадреналина и антидиуретичния хормон като животоспасяващи терапевтични процедури при шокови състояния са известни. Относно приложението на канаванина то е все още в сферата на бъдещите проучвания.

4.3.2. Ефекти на канаванин върху миокардната дисфункция при септичен шок

Свръхпродукцията на NO чрез iNOS играе роля в патогенезата на септичния шок. Депресията на сърдечния контрактилитет е медиирана посредством редица ендогенни фактори, продукти на активирания клетъчен отговор – провъзпалителни цитокини, включващи IL-1β и TNF (Kumar et al, 1996).

В опити за превенция на миокардния контрактилитет (върху изолирано, работещо сърце) при експериментален септичен шок у плъхове е прилаган неселективния iNOS – L-NAME и селективния L-Cav (Suzuki et al, 2002). Те участват в предотвратяване ефектите на посочените цитокини, като проявяват специфичност и различия. Така например L-NAME е по-ефективен за възстановяване хипотензията и хипореактивността. Той значително редуцира пулсовото налягане и сърдечната честота. Предполага се, че механизмът на действие е чрез инхибиране на NOS-конститутивната и индуцибилната синтаза.

Ефектът на L-Cav се отличава от този на L-NAME. Той не намалява основния коронарен кръвоток, не редуцира сърдечната дейност в сравнение с контролните сърца. Тези резултатите биха имали значение за бъдещи изследвания свързани с взаимодействията между шокогенните ендогенни медиатори, обуславящи мощната съдова депресия в условията на септичния шок и ендогенните фактори, противодействащи чрез вазоконстрикция и блокирайки вазодилатиращи субстанции (Uribe et al, 1999; Guzman et al, 2003).

4.3.3. Ефекти на канаванина при остър, некротизиращ панкреатит

Острия некротизиращ панкреатит е тежко състояние с висока степен на летален изход, за лечението на който няма специфични терапевтични средства с доказана

ефективност. Съпроводен е с бързо отключване и прогресиране на синдрома на системен отговор чрез възпаление, водещ до шоково състояние. В този процес ключова роля играят цитокините, продукти на активирани макрофаги, левкоцити и др. тъканни фактори в отговор на острия възпалителен процес. Те включват TNFα, IL-1β, IL-β, IL-6 и IL-8 (Chen et al, 1999). Отключената каскада от медиатори води до тежки структурни патологични промени, а един от финалните медиатори е азотния оксид.

При физиологични условия е известно, че ниски концентрации на NO се отделят от eNOS, включвайки се в регулацията на регионалния кръвен ток и артериалното налягане.

При стимулиране от липополизахарид на E.Coli или различни цитокини, iNOS се освобождава от различни клетки, включително и от съдовите гладкомускулни клетки. Вазодилатацията се подпомага от продукцията на известно количество NO. В крайна сметка всичко това оказва ефект за отключване и развитието на панкреатичния шок.

Изучени са ефектите на инхибитори на NOS в условия на експериментален модел на остър панкреатит върху плъхове, индуциран посредством ретроградeн рефлукс на жлъчни соли (Chen et al, 2004). Ефектите им са сравнени с тези на L-NAME и на селективния iNOS инхибитор - L-Cav. При L-NAME леталният изход е 3-5 часа след индуциране на панкреатита. L-Cav редуцира значително стойностите на серумните амилаза и липаза, а данните от хистопатологичната картина показват ограничаване на отока, некрозата и асцита в сравнение с контролната група.

Отчетена е също редукция на САН, както и на системната съдова резистентност. Необходимо е да се подчертае, че положителният ефект на L-Cav при остър панкреатит все още не е изяснен.

4.3.4. Ефекти на канаванина върху туморния растеж

В опити при експериментален карцином на дебелото черво при плъх е показано, че канаванинът потиска неопластичния растеж (Rosenthal et al, 1977). Животните с тумор са били третирани от момента на достигане големина на тумора 5 - 10см с дози 2 g/kg или 3g/kg дневно в продължение на 5 или 9 дни. Резултатите показват редукция на туморния растеж, както следва: в 22% от плъховете получили 3 g/kg/ден

за 5 дни и в 60% при групата инжектирана със същата доза какнаванина за 9 дни. Следователно, канаванинът потиска растежа на colon-carcinoma при плъхове.

Известно е, че канаванинът е мощен антагонист на аргинина с доказан инхибиращ ефект по отношение на човешки colon-carcinoma и туморните клетки са значително по-чувствителни към леталния ефект на γ-облъчването.

Показано е, че канаванинът повлиява Walker carcinosarcoma – 256 – клетки, а по-късно е потвърдена и антитуморната му активност (Kruse et al, 1958).

Експериментално е доказано, че той има инхибиращ ефект спрямо човешката клетъчна панкреатична карциномна линия Mia Pala-2 (Swaffar et al, 1994; Green & Ward, 1983).

Други автори установяват, че канаванинът понижава преживяемостта на човешки меланомни клетки и същевременно повишава чувствителността им към топлинно въздействие (Black & Ningaraj, 2004). Доказано е, че той индуцира синтезата на топлинно-шокови протеини, които спомагат за топлинната сенсибилизация на меланомните клетки (Black & Ningaraj, 2004).

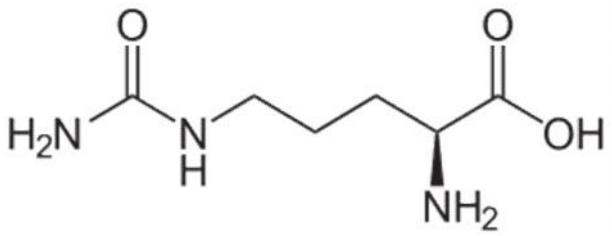
Цитотоксичната, инсектицидна и антиметаболитна функции на канаванина не са напълно проучени (Horstman, 1989).

Важна база доказваща антиметаболитните свойства на аминокселината се заключва и в неспособността на arginyl-tRNA-синтетазите на Cav-чувствителните видове да направят разлика в привидната адекватност между L-Cav и L-arg. Този факт дава своите резултати в погрешната инкорпорация на Cav в протеините, което може да е причина за структурна и функционална протеинова аберация. Доказоно е, че появата на структурни аберантни “Canavanyl”-протеини е следствие на такава инкорпорация, отключваща структурни и функционални промени (Rosenthal et al, 1989).

4.4. Цитрулин

4.4.1. Изолиране и биосинтеза на цитрулина

Органичното съединение citrulline(cit) е α-аминокиселина (α-amino-δ-carbamido-valeric acid) (Фиг. 8). Наименованието й произлиза от citrullus – латинската дума за диня (citrullus lanatus) в съставаа на чийто сок е открита първоначално. Изолиран е за първи път от Wada през 1930. Той изяснява структурата на Cit и провежда синтезирането му от орнитин.



Фиг. 8. Citrulline

В последствие съединението е изолирано от гнилостни бактерии и Bacillus ruosyaneus чрез метаболизъм на аргинин, а също и от смилането на казеина (Wada, 1930).

Цитрулинът се явява ключово междинно съединение в урейния цикъл основен път за екскреция на токсичния NH_3 при бозайниците. Съществува предимно в черния дроб, където е включен в този съществен детоксикационен път. Необичайната, неесенциална АК, се образува в урейния цикъл чрез добавяне на CO_2 и NH_3 към орнитина (Фиг. 3.). В хода на реакцията в комбинация с аспартинова киселина се образува аргинин-сукцинова (янтарна) киселина, която на свой ред по-късно метаболизира в аминокиселината аргинин, реакция катализирана от NOS. Аргининът първоначално се окислява до N-hydroxy-L-arginine, който в последствие окислявайки се, се превръща в цитрулин. Този процес е съпроводен с отделяне на азотен оксид. Следователно, *цитрулинът е прекурсор на аргинина*. От първоначалното му изолиране основно от сока на диня са изминали много години, но съвременните методи на изследване биохимични, физични и др. са насочени към прецизиране и разширяване познанията, свързани с аминокиселината цитрулин.

С помощта на т. нар. “гас-мас” метод, използващ система газов хроматограф – мас – спектрометър (GC-MS) е доказано количественото разпределение на Cit в различните части на динята (Rimando et al, 2005). Методът е разработен с цел отделянето на Cit от глутаминовата киселина. Резултатите показват, че цитрулиновото съдържание варира от 3,9 до 28,5 mg/g сухо тегло, което е основно в кората, следвано от сърцевината на динята. Червената на цвят сърцевина на плода е по-богата на Cit, сравнено с жълтите и оранжевите, както и тези, които не съдържат семки, са с известен превес на аминокиселината.

4.4.2. Цитрулин - биомаркер при редица патологични процеси

Цитрулинът е надежден биомаркер при редица патологични процеси. Той не е директно кодиран от ДНК. Известно е, че някои протеини съдържат Cit като резултат на една постранслационна модификация.

Цитрулинът се разгражда с помощта на група ензими, наречени peptidylarginine deminases (PADs). Тези ензими превръщат аргинина в цитрулин в процеса, наречен citrulination или deamination. (т.е. цитрулинация или деаминация).

Протеините, съдържащи Cit-остатъци, включват myelin basic protein (MBP), fillagrin, някои histone-протеини, fibrin и vimentin. Те са включени чрез Cit в процесите на клетъчната смърт, тъканната алтерация и възпаление.

При пациенти с ревматоиден артрит са открити антитела срещу протеини, съдържащи Cit (anti-citrullinated protein antibodies). Не е напълно изяснена ролята на Cit в това заболявания, участието му в патогенезата и диагностиката. Ето защо участието на Cit при ревматоидния артрит представлява голям интерес за бъдещите проучвания (Coenen et al, 2007).

Плазменото ниво на Cit е важен диагностичен белег при пациенти с необратима чревна недостатъчност или при синдрома на късото черво (short-bowel syndrome – SBS), причинен от редица известни и не до там етиопатогенетични фактори, нарушаващи целостта на тънко-чревната мукоза. Този процес е характерен при болестта на Crohn, след приложена радио-терапия в област, засягаща тънките черва, както и след приложена, животоспасяваща тънко-чревна трансплантация. В литературата има интересни експериментални проучвания с морски свинчета след тънкочревна резекция (Honzova et al, 2009).

В случаите на модерирано и на остро настъпващо отхвърляне на трансплантанта или на остро клетъчно отхвърляна (ACR) плазменото ниво на Cit рязко намалява и той се явява *биомаркер* с изключителна клинико-прогностична значимост. Логично е да се предпочете този бърз метод за определяне на ACR като раннопрогностичен, а също и с оглед приетата схемата за потискане реакцията на тъканно отхвърляне. Методът се използва като максимално щадящ, неинвазивен в условия на рязко ограничените възможни класически методи за изследване на стомашно-чревния тракт след резекция.

Цитрулинът в тази система на организма се получава главно от превръщането на глутамина в ентероцитите, локализирани в средната и горна част на интестиналните

вили. Поради това цитрулинът се оказва *прецизен маркер* за състоянието на чревната мукоза. Той е един от най-ранните клинични показатели, чието понижаване подсказва за тежки усложнения при отхвърляне на трансплантанта или при намалени функционални ентероцити. Нарушената чревно-мукозна бариера може да доведе до бактериална транслокация с последваща токсемия и тежък ендотоксинов шок. Неотдавна беше докладвано за промени в цитрулиновото плазмено ниво при индуцирана тънко-чревна атрофия при Sprague-Dawley плъхове вследствие химиотерапия (Petersen et al, 2008). Известно е, че химиотерапията предизвиква гастроинтестинален мукозит, който е общ доза-лимитиращ страничен ефект при онкоболните. Плазмената Cit-концентрация при експерименталните животни рязко спада 24 часа след последната доза приложен 5-Fu и се възстановява 6 дни по-късно. Показано бе, че съществува значима позитивна корелация между плазмената Cit-концентрация и абсолютната тънко-чревна маса, което най-вероятно се дължи на факта, че след определен период от време настъпва нова пролиферация на ентероцитите и те възвръщат способността си към съзряване и възстановяване на Cit-продукцията с последващото му попадане в общата циркулация.

Цитрулинът е важен показател за наличие на ентероцитна маса. Той е индикатор за парентералното хранене при HIV-инфектирани пациенти с токсична диария, дължаща се на антивирусната терапия (Green et al, 2009). Цитрулиновото ниво може да подпомогне за отдиференцирането между протеазно-инхибиторната токсична диария и инфекциозната ентеропатия, както и да за определяне на количествено-функциониращата ентероцитна маса. Тя е индикация за необходимостта от парентерално хранене.

Съществуват експериментални данни, че добавки от L-Cit и L-Arg забавят атеросклерозата при животни, обременени с храни с високо съдържание на холестерол (Hayashi et al, 2005).

4.4.3. Цитрулин и уремия

При пациенти с бъбречна недостатъчност значително се променя метаболизъмът и плазмени нива на аминокиселинния състав. Повишена е концентрацията на цитрулина, като степента й корелира с увредената бъбречна функция при уремичните пациенти и в по-слаба степен зависи от белтъчния внос. Експерименталните модели са на базата на тези данни. Хроничната уремия при

плъхове е в резултат на завишени цитрулинови нива, при което се наблюдава повишена продукция и/или намалена утилизация. Наред с това е променена активността на ензимите свързани с урейния цикъл.

Активността на чернодробната орнитин-транскарбамилаза (OTC) и бъбречa аргинин-синтеза (AS) е по-слаба в уремичните плъхове. Стойностите на цитрулина се свързват с ограничената способност за използването му при образуване на аргинин (Chan et al., 1974).

При плъховете цитрулинът се синтезира в чернодробните митохондрии след като премине в цитозола. Съществуват две възможности – превръщане в аргинин или попадане в кръвния ток. Плазмения Cit на свой ред е източник за аргинин и урейна синтеза в тъканите, притежаващи съответните ензими.

Освен в черния дроб е доказано превръщане на цитрулина в аргинин и в бъбреците (Featherston et al, 1973).

4.4.4. Други ефекти на цитрулина в организма

Както отбелязахме по-горе, цитрулинът е аминокиселина, представляваща важна съставка на черния дроб. Използван е от организма за отстраняване на токсични продукти като амоняк (NH_3). Детоксикацията на чернодробните клетки е невъзможна без цитрулина (Cox et al, 2000).

Той има значение за имунната система, участва в състава на специализирани протеини в кожата, косата и нервните клетки, подпомага преодоляването на умората и стреса, което е от голямо значение при активно спортуващите, особено атлетите, както и при повечето хора с инцидентно и екстремно натоварване (Coenen et al, 2007).

Цитрулинът предизвиква вазодилатация, подобрява кръвоснабдяването и тъканното снабдяване с O_2 , повишава нивото на NO използван от мускулите. Той редуцира натрупаната млечна киселина при тежка мускулна работа, като спомага на организма да елиминира токсичния, увреждащ тъканите NH_3 чрез урейния цикъл.

Освен горе описаните ефекти цитрулинът е и потенциален антиоксидант. В САЩ както и в други страни цитрулинът се приема като хранителна добавка. За олимпийските игри в Пекин през 2008г., за спортистите Япония предоставя цитрулин в различни „опаковки” и форма, като е в състава на снаксове, цитрулинови дъвки, цитрулинова вода и др. напитки за спортистите, произведени от Asahi Drinks (подразделение на една от най-големите бирени пивоварни в Япония).

5. Азотно-оксидни синтази (NOS)

5.1. Азотна екскреция. Уреен цикъл.

Азотната екскреция е проучена интензивно при гръбначните, но в по-малка степен при безгръбначните. Инсектите, паразитите и др. безгръбначни притежават способността да отделят амониеви йони под формата на пикочна киселина. Тези организми са означени най-общо като урикотелни.

Уреята може да се получи от всеки един от посочените източници, аргинина в храната, който се разгражда чрез аргиназа, уреята от храната, която се отделя непроменена от организма, пурини, разграждащи се в цикъла на пикочната киселина,от NH_3 и бикарбонати чрез орнитин-урейния цикъл.

Урейния цикъл представлява основния метаболитен механизъм за отстраняването на високотоксичните амониеви йони от организма. Аргиназата е един от петте ключови ензими в урейния цикъл, а останалите са карбамоил-трансфераза, аргининосуксинат лиаза и карабомоил фосфат синтеза. Аргиназата е протеин, широко разпространен в биосферата, открит в множество организми, от бактерии, растения, безгръбначни и гръбначни. Болшинството изследвания са съсредоточени върху чернодробната аргиназа (Jenkinson et al., 1996; Lavulo et al., 2001).

Освен в синтезата на урея в черния дроб, аргиназата се включва в биосинтезата на полиамини и пролин (Kaysen & Strecker, 1973), превръщането на аргинин в α-кетоглутарат за окислението в цикъла на Krebs (Portugal et al, 1983); в адаптивните отговори спрямо аноксия при някои безгръбначни (Carvajal et al, 1988); както и при продукция на урея – при необходимостта от участието й в осморегулаторни функции.

5.2. Образуване и биологично действие на азотния оксид

Азотния оксид (NO) участва в регулацията на много и разнообразни физиологични функции и процеси, така както и при патологични състояния, застрашаващи живота. След образуването му в съдовите ендотелни клетки действието на NO е като на паракринен хормон, който повлиява само съседни клетки. След попадането му в кръвта много бързо се инактивира от хемоглобина. В отговор на разнообразни стимули, предизвиква вазодилатация и поддържане на съдовия тонус т.е. има значение в регулацията на кръвотока и артериалното налягане (Sessa, 1994).

Към биологичните свойства на NO се включва инхибиране на агрегацията и адхезията на тромбоцитите, левкоцитите, стимулиране на гладкомускулната пролиферация.

Синтезиран в невроните на ЦНС, азотният оксид действа като медиатор и участва в процесите на запаметяване, модулиране на болката и др.

При бозайниците синтезата на NO в клетките е свързана с метаболизма на аминокиселината L-аргинин. От гуанидиновия азот на тази аминокиселина се образува NO под действието на азот-оксид синтаза (NOS) с образуване на преходен хидрокси-L-аргинин и L-цитрулин (Nathan et al, 1994; Nelson et al, 1997). L-аргининът, освен от NOS се метаболизира и от аргиназите до урея и L-орнитин. От друга страна аргиназата е ключов ензим в цикъла на уреята, както бе отбелязано вече. Посредством този път от организма се отделят силно токсични амониеви йони от белтъчната обмяна (Carvajal et al, 1988). Аргининът се оказва междинно звено на няколко клетъчни метаболитни системи - синтез на NO, цикъла на уреята и образуването на креатинин. В крайна сметка биосинтезата на NO и урейния цикъл са главните пътища на орнитиновия метаболизъм (Фиг. 3).

5.2.1. Азот-оксидни синтази, изоформи

Азот-оксидните синтази (NOS) представляват флавопротеини, NAD(P)H-зависими, оксидоредуктази. В голяма степен притежават подобен аминокиселинен състав и първична структура. Различават се по двата си активни центъра - оксигеназен (N-край) и редуктазен (C-край).

Известни са три изоформи на NOS, които са кодирани от три различни гена. Те са строго специфично разпределени в различни органи и тъкани. Разделени са в две групи: конститутивни (NOSI и III) и индуцибилна (NOSII). Конститутивните се означават още и като nNOS и eNOS и са описани съответно в неврони и съдови епителни клетки. Известно е, че те са Ca^{2+} зависими и при достатъчни нива се свързват с калмодулина. Участват в невротрансмисията и в регулацията на сърдечно-съдовата система (Förstermann, 1998; Nakane et al, 1993).

Азотоксидната синтаза II, означавана още като индицибилна - iNOS е Ca^{2+} - независима. Синтезира големи количества NO за по-продължителен период. Експресията на този ензим е установена в бъбреците, епитела на респираторния тракт, ретината и скелетната мускулатура. Тя има пряко участие в процесите на

възпаление и промените в имунния статус, тъй като при стимулиране на имунитета, се повишава транскрипционната активност на iNOS-гена (Uribe et al, 1999).

5.2.2.Източници на азотен оксид и стимулиране на NO-продукцията

Не само при физиологичните процеси и функции, но и при редица патологични процеси продукцията на NO се повишава или понижава. При тези процеси важна роля има взаимодействието между аргиназите и ензимите, метаболизиращи L-аргинина и NOS при непрекъсната (спрямо условията) конструкция за утилизация на аргинина (Kishimoto et al, 1996).

Към агонистите на ендогенна секреция на NO се отнасят ATP, ADP, серотонин, ацетилхолин, SP, брадикинин, ангиотензин II, ET-1, хистамин, както и намиращите се в ендотела β-адренорецептори.

5.2.3. Инхибиране на на азотнооксидната продукция

Болшинството от инхибиторите на NOS съдържат амидино- или уреидо-групи, подобни на гуанидин-групата на L-аргинина. Те проявяват конкуриращ ефект в ролята на субстратни инхибитори на NOS.

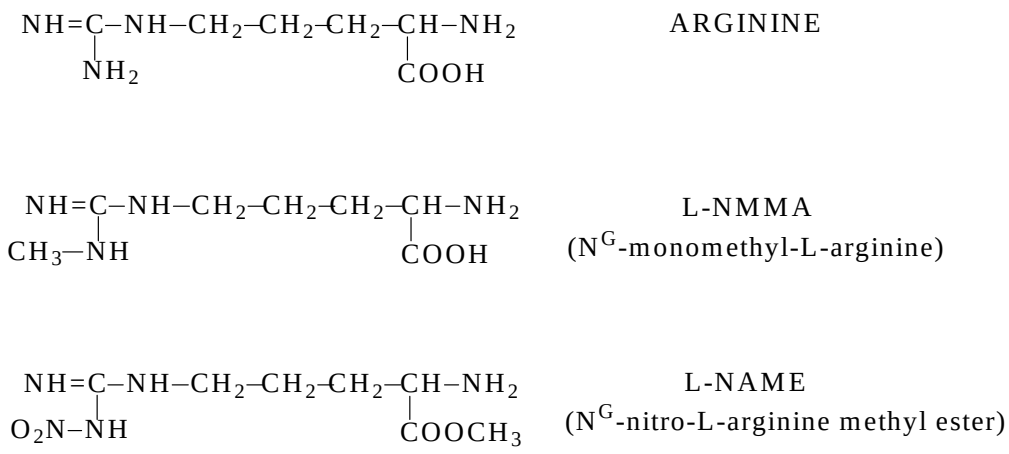
За първи път Moncada и сътр. използват инхибитора L-NMMA-аргининов аналог с модифицирана гуанидинова аминогрупа. Известни са и други инхибитори на NOS, а именно L-NNA, L-NAME, L-ADMA, L-canavaline, L-NIO (Knowles et al., 1989; Knowles & Moncada, 1994). При заместване на аминогрупата на аргинина, тези съединения губят инхибиторната си активност, а ако се удължи въглеродната им верига проявяват намален инхибиторен ефект.

Много от аргининовите аналози могат да бъдат инхибитори на NOS. Повечето от тях, като L-NAME и L-NMMA са неселективни, а към специфичните по отношение на iNOS се отнасят L-NIO и L-canavaline (Фиг. 9).

5.2.4. Ефекти на азотния оксид

Азотният оксид се свързва с хеминовото желязо на разтворимата гуанилатциклаза (GC) и така тя се активира, като се образува цикличен

гуанозинмонофосфат (cGMP). Той от своя страна действа на специфични таргетни структури и реализира своето биологично действие.



Фиг. 9. Структура на L-аргинина и на NO синтазните инхибитори N^G-монометил L-аргинин (L-NMMA) и N^G-нитро- L-аргинин метил естер (L-NAME)

Известни са две изоформи на GC в зависимост от клетъчната им форма – разтворима и мембранно свързана. Мембранно свързаната не се стимулира от NO, а разтворимата е NO-чувствителна.

Формирането на NO от L-Arg в ЦНС е изучено в експеримент от преден мозък на плъх с трансдукционен механизъм за стимулиране на разтворимата гуанилатциклаза (Knowles et al., 1989). База за тези изследвания е установения по-рано факт, че L-Arg е един ендогенен активатор на разтворимата в мозъчната тъкан гуанилатциклаза.

Активирани макрофагите също синтезират NO_2^- и NO_3^- от терминалните гуаниднитроген атом(и) на L-Arg. Тази реакция преминава през образуването на NO и е от голямо значение за токсичната активност на тези клетки (Costa et al, 1993; Yamada et al, 1995; Dixit et al, 1999).

Разтворимата гуанилатциклаза в мозъка се стимулира от редица медиатори (Knowles et al., 1989). Участието на L-arganine-NO биохимичният път играе важна, регулаторна роля, а неговата модулация води до различни често непредвидими или неизвестни реакции и съответни последици (Crosbi et al, 1995; Fiebe & Koesling, 2003).

6. Стрес-индуцирана аналгезия

Под въздействие на стресори върху организма се подтиска болката и говорим за феномена стрес-индуцирана аналгезия (SIA), който се изучава интензивно вече повече от три десетилетия. Оказва се, че той е сложна комбинация от индивидуална чувствителност, зависеща от многообразни по вид, характеристика, интензитет, повторимост и пр. фактори, свързани със стреса. От друга страна е повлиян и от възрастта на индивида, пола, физическото и психическо равновесия по време на стрес-въздействието; от опита, вследствие предишни контакти с различни стресори, както и познанието за усешането за болка, която те са причинили.

Стрес-индуцираната аналгезия отключва освобождаването на редица медиатори, активирайки десцендентните, инхибиращи болката пътища. Усилията на фармаколози, физиолози, невролози, имунохистохимици и редица научни изследователи в областта на изучаването на стреса, болката и свързаните с тях широк спектър патологични промени, са наистина оправдани и намират своя израз в редица постижения. Демонстрирани са участието на голям брой невротрансмитери и невропептиди при SIA. Ключова роля се отрежда на ендогенните опиоиди, моноамини, канабиноиди, ГАМК, както на глутаматната система.

6.1. Еволюционното развитие и генетичната основа на SIA

Болката може да се разглежда в еволюционен аспект като защитен отговор на организма спрямо стимули, предизвикващи болка. Поведенчески реакции, свързани с страх, тревожност или избягващи болката, могат да се разглеждат като част от защитната система на организма срещу стимули, които биха я причинили (Fanselow, 2000).

В исторически аспект болката и страхът са разглеждани като две отделни звена. Проучванията при гризачи водят до предположения, че се редуцират ноцицептивните поведенчески реакции при въздействие на стимули предизвикващи страх, асоциирани с "изучения", опознатия вече страх (Madden et al, 1977; Finn et al, 2004, 2006). От еволюционна гледна точка SIA би могла да се разглежда като съставна компонента от класически отговор към стреса на принципа *”борба или бягство”*. Така тенденцията при болезнени наранявания, които при по-нататъшно увреждане застрашават организма със смъртен изход не би се развила като водеща за оцеляването на

съответния организъм. Когато организъмът е извън опасност, то повишената ноцицепция в резултат на дадено въздействие (на затихващ отговор на омраза) поведенческата реакция се нормализира.

При първите модели с цел търсене генетичните основи на този феномен са използвани селективен щам мишки с висока чувствителност (HA) или ниска (LA) към SIA при tail-flick тест (Panocka et al, 1987, 1991). Изследванията групирани около тези два типа мишки откриват някои фенотипни особености, различаващи се по относително малък брой генетични локуси. Високочувствителните мишки проявяват повишена чувствителност към морфина, както и към опиоидните рецепторни антагонисти, показвайки значително по-висока степен на взаимодействие с ендогенната опиоидна система в сравнение с мишките с ниска чувствителност (Lapo et al, 2003). Усилията да се открие генотипна основа за тези различия, разкриват изненадваши резултати. Първо, кръстоската между HA с мишки с висока чувствителност към морфин води до появата на някои с променена чувствителност, както и такива *"super-HA"-мишки*. Кръстоската пък на LA мишки с такива с доказана слаба чувствителност към морфин поражда два типа мишки с отпаднали свойства на LA мишките и втори тип *"super-LA"-мишки*. Тези експерименти показват, че чувствителността към морфина и SIA са разположени в различни генетични локуси.

Второ, показано е, че LA мишките имат по-високо съдържание в мозъка на μ-и β-опиоидрецепторна RNA в сравнение с HA (Kest et al.,1999). Тези резултати са в *противовес* на данните от по-ранно проучване, при което μ-опиоид-рецепторно свързване е повишено в медиалния хипоталамус при HA-мишките, в сравнение с LA-мишките.

Трето, въпреки множеството фенотипни различия между HA и LA мишките само един или два локуса вероятно медиират чувствителността към SIA и появата на тези свързани фенотипи, които могат да възникнат само след една генерация.

Пълното заличаване на SIA сензитивността на селективната линия описани мишки се случва едва след повече от 21 генерации. В крайна сметка SIA сензитивността не се съхранява за много дълго време, но все пак се запазва фундаменталната генетична база за съществуването й.

6.2. Модели на стрес-индуцирана аналгезия

Изследванията в областта на механизмите на SIA дават насоки и в изучаване физиологичните механизми на болката, стреса, страха, което в крайна сметка, повлиява и терапевтичния подход спрямо тези нарушения тясно свързани със SIA.

В последните десетилетия учени от различни специалности създадоха редица модели на SIA. Тези модели биха могли да се разделят най-общо на две големи групи - безусловна SIA и условна SIA (позната още като обусловена страхова аналгезия-FCA (fear-conditioned analgesia).

6.2.1. Безусловна SIA

Два стимула са необходими за моделирането на SIA - един болков и един-аверзивен. Аверзивните стимули от своя страна могат да бъдат безусловни и условни. По време на безусловна SIA се прилага безусловен стрес-стимул или фактор от околната среда с цел индуциране аналгезия преди или по време на излагането на стимул предизвикващ болка.

Безусловните аверзивни стимули, използвани при животинските модели включват най-разнообразни стимули: footshock, форсирано плуван, изолиране на новородените от майките, рязка промяна на хабитата, предизвикване на социален конфликт, съжителство в близък контакт на хищник и жертва с постоянна заплаха от ухапване (Nowak et al., 2013).

При хората са разработени модели с прилагане на неприятни визуални стимули, хипноза и акупунктура. При гризачите са използвани също и инвазивни процедури, включващи електрически или фармакологични стимулации директно в различни мозъчни области (Knapska et al., 2009, 2012).

6.2.2. Условна SIA (известна като условна страхова аналгезия - FCA)

Условната страхова аналгезия може да бъде дефинирана като един отговор на оцеляване, който се изразява в подтискане на болката при въздействие на болков стимул, с който обекта е имал вече съприкосновение и естествено, условно развито чувство на страх (Knapska et al., 2009). Всъщност FCA възниква като Павловски условен рефлекс. Характеризира се с рязко понижена ноцицепция при модели с гризачи. Пикът на това подтискане и на супресията на поведенческите реакции, свързани с болката, може да достигне повече и от 90% (Harris & Westbrook, 1995; Finn et al., 2004).

6.3. Зависимост на SIA от вида на увреждащите фактори и отрицателни стимули

Изследванията на болката са показали най-общо, че не всички увреждащи стимули имат общи пътища на централно или периферно ниво. Известно е, че не всички отрицателни стимули могат да доведат до аналгезия, а по-скоро биха предизвикали хипералгезия (Finn et al., 2006). Плъхове с хронична болка в присъствие на допълнителен отрицателен стимул не проявяват изразени реакции и променено поведение в сравнение с тези при остра болка (Finn et al., 2006; Ford et al., 2008).

При деца в хроничен стрес в резултат на често възникваща абдоминална болка SIA е по-слабо изразена (Dalman, 1993; Duftom et al., 2007).

При модел на топлинна SIA стресът може да предизвика вазоконстрикция в опашката и лапите на опитните мишки, което води до понижаване температурата на кожата (Blessing, 2003).

Психофизикални изследвания с прилагане на инфрачервена термография за мониторинг на локални промени в температурата измерена на опашката показват, че болшинството от забавянията между прилагането на топлинния стимул и поведенческата реакция могат да се отдадат на физичния процес, а именно затопляне на кожата (Benoist et al, 2008).

Може да се обобщи, че индуцирането на тревожност повишава чувствителността към болката, докато предизвиканият страх намалява сензитета нея.

6.4. Полово-свързани различия при експресията на SIA

В редица изследвания е доказано зависимостта на SIA от пола (Teskey et al, 1984; Panocka, Marek et al, 1987, 1991). Подобно на аналгезията, инициранa чрез най-разнообразни стимули мъжките плъхове показват по-висока чувствителност към SIA в сравнение с тази при женските (Marek et al, 1986).

При модел на SIA вследствие продължително плуване в студена вода и при модел с плуване в студена вода с интервали от прекъсване е наблюдавана различна чувствителност към SIA. При интактни женски плъхове и кастрирани мъжки аналгезията е еднаква, което потвърждава ролята на гонадните стероиди в медиирането на SIA (Bodnar et al, 1983, 2002).

6.5. Влияние на възрастта и опита върху SIA

Познати са редица проучвания, които доказват, че възрастта и придобития опит повлияват стрес-индуцираната аналгезия. Така например, при опити чрез потапяне във вода аналгезия възниква при 3-дневни плъхчета и се увеличава при 7-дневни. Тези изследователи предполагат, че повишената аналгезия на тази възраст се развива заедно с развитието на супраспиналната десцендна болкова инхибиция.

Други опити с плъхове също потвърждават възрастовата зависимост и повишената SIA при продължителното прилагане на Acetyl-L-Carnitine. Докато в опити с мишки, инжектирани с формалин в задната лапичка, (предизвикващ болка) се наблюдава по-изразена SIA в ранна възраст 4>24>48 седмици, а стресът е в резултат на форсирано ходене (Onodera et al., 2001).

6.6. Дифузен, инхибиращ нервните стимули контрол (DNIC)

Дифузният инхибиращ нервните стимули контрол обобщава и изразява строга инхибиция на неврони в дорзалния рог на гръбначният мозък, при прилагане на ноцицептивен стимул, в която и да е част от тялото отдалечена от полето на рецепторното възбуждение. Той е подобен на SIA и е демонстриран при стрес-модели на гризачи (Chen, 1985).

Съществува връзка между механизмите медииращи DNIC и SIA, както и при тяхното припокриване при действие на увреждащ стимул. Известно е, че двата феномена DNIC и SIA могат да бъдат отдиференцирани на невроанатомично ниво. Експериментите имат за цел изясняване супраспиналните компоненти в десцендентния път, инхибиращ болката, както и в търсене на области в мозъка имащи ключова роля за SIA. Така например лезиите в средномозъчния PAG, rostral ventromedial medulla или locus coeruleus не променят DNIC при гризачи (Bouhassira et al, 1992а,б; 1993). Лезии в subnucleus reticularis dorsalis в medulla caudalae рязко редуцират DNIC. Следователно, както при SIA така и при DNIC опиоидната и серотонинергичнта системи играят роля (Bouhassira et al., 1988).

Тези две форми на ендогенната аналгезия не могат да се разделят невроанатомично, тъй като вероятно съществуват различни степени на конвергенция между тях на ниво невротрансмитери/невромодулатори.

6.7. Невронални субстрати участващи в SIA

През 17 век Рене Декарт дава предположение, наречено от него *"специфична теория"*, според което интензитета на болката и тъканното увреждане са директно свързани. Години наред тази теория остава в сила въпреки факта, че болката може да се модулира от редица фактори, които включват опита и емоционалното състояние, също и съществуването на фантомната болка след ампутация.

Според *"gate control"* теорията, описана за първи път от Melzack, болката е модулирана чрез взаимодействие между невроните на спинална ниво, но не и чрез директно активиране на рецепторите за болка. Според тази теория се предполага, че не-ноцицептивните Aβ фибри формират синапси заедно с ноцицептивните Aδ и C фибри (Melzack & Wall, 1962;1965). Активирането на Aβ фибрите би *"затворило портала"* за ноцицептивните сигнали. И обратното, активирането на ноцицептивните фибри би довело до инхибиране трансмисията на неноцицептивни сигнали и да доведе до *"отваряне на портала"*. Теорията за *"gate control"* е категорично важно звено в изучаване модулирането на болката.

Супраспиналната модулация на болката може да включва както усилване на ноцицепцията, позната като десцендентно улеснение, така и редукцията й позната като десцендентно инхибиране (Akil et al., 1972; 1976a,b).

Интересен е факта, че субстратите и анатомичните области, включени в улеснението и инхибирането на ноцицепцията се оказват често идентични. Доказано е, че механизмите на улесняване или инхибиране на ноцицепцията и най-вече различията между тях са на рецепторно ниво (Millan et al., 2002). Първични аферентни неврони в или около епидермиса отчитат болезнени стимули, които могат да бъдат химични, температурни или механични. Тези първични аферентни неврони проектират и провеждат ноцицептивната информация към дорзалния рог на гръбначният мозък.

Ноцицептивната информация е свързана директно с мозъчната кора, както и индиректно към него чрез мозъчния ствол, средния мозък и таламуса през асцендентния път на болката (Millan et al, 1999).

Десцендентният път на болката се генерира в кортекса или хипоталамуса и завършва в гръбначният мозък (Millan et al, 2002). Невроните в мозъчната кора на свой ред също така препредават ноцицептивната информация към амигдалата, хипоталамуса или директно към PAG.

6.7.1. Мозъчна кора

Невроните от първичната соматосензорна област на мозъчната кора разграничават ноцицептивните сигнали, докато невроните в медиалната префронтална област на мозъчната кора определят интензитета им (Zhang et al., 2003a, b,c).

Префронталната мозъчна кора е включена в процеса на запаметяване на болковите стимули (Huguest et al., 2004). Електростимулацията в определени зони на мозъчната кора (например cingulum-сноп) преди и след формалиново инжектиране при плъхове предизвиква значително понижаване на болковото усещане по време и на двете фази на формалиновия тест (Fuchs et al., 1996; Fuchs & Melzack, 1996).

Лезии във фронталния кортекс водят до блокиране на опиоидната и неопиоидна хипоалгезия (Zhang et al., 2003a, b,c).

6.7.2. Хипокамп (HC)

Малко са изследванията относно ролята на HC при SIA (Hobin, 2006; McEwen, 1997, 1998). По-късни опити показват ролята на холинергичната, опиоидергична и ГАМК-ергичната системи при медиирането на ноцицептивната трансмисия в дорзалния HC на морски свинчета (Favaroni Mendes & Menescal-de-Olivera, 2008).

Лезиите в областта на вентралния HC в новородени плъхчета промяна способността за дълго време да развият усещането за ноцицептивни сигнали при hot-plate, paw- pressure и tail-flick -тестове (Al Amin et al, 2004; Meagher et al., 2001). Опитите с лезии в различни области на HC определят неговата роля и при страх. Резултатите имат пряка зависимост от следните условия: субрегионална лезия; осъществена лезията; тип страхова реакция (овладяване, изява, консолидация, угасване) (Fanselow et al, 2000; Hobin et al, 2006; Sutherland et al, 2008).

6.7.3. Амигдала

Амигдалата има роля в медиирането на условния и безусловен страх, сигнала за болка, както и при SIA. По-ранни изследвания с морски свинчета показват, че електростимулацията на амигдалата могат да предизвикат алгезия или аналгезия в зависимост от областите на стимулиране (Lico et al., 1974).

При опити с индуцирана от формалин ноцицепция при плъхове се доказва, че такава стимулация редуцира усещането за болка (Mena et al., 1995).

Ключова се оказва ролята на амигдалата и при SIA. Лезии в централната й зона водят до безусловна SIA при плъхове след 20-минутен footshock (Werka & Marek, 1990; Werka & Zieliński, 1998). В друга серия от опити е показано, че такива лезии предизвикват и FCA (Helmsteter H. et al, 1992). При изследвания с хора е наблюдавана отрицателна корелация между аналгетичния ефект и невроналната активност в контралатералната амигдала измерена чрез fMRI (Zhang et al., 2003). Наблюдавана е при електроакупунктура със слаба и висока интензивност, както и при опити с лъчиста топлина, повишаваща болковия праг (Zhang et al., 2003).

Амигдалата получава ноцицептивна информация от първичната соматосензорна кора и може да предава или да получава ноцицептивна информация от PAG в средния мозък (Helmstetter et al, 1993).

6.7.4. Periaqueductal gray (PAG)

Доказано е, че невронални връзки модулират ноцицептивни сигнали, както и че медиират SIA. Редица изследванията показват, че директна стимулация на PAG елиминира реакциите спрямо различни патогенни стимули като електрошок, тъканна пост-травматична деструкция, затопляне на опашката (Akil et al, 1972). По-късно е доказана, редукция на усещането за болка след формалиново инжектиране и паралелно стимулиране на PAG (Dennis et al., 1980). Тези ранни изследвания доказват, че PAG е важна компонента за десцендентния, инхибиращ ноцицептивен път.

Лезии на дорзалния или латералния PAG при модели на плъхове с FCA премахват антиноцицептивния сигнал (Helmstetter et al., 1993). Така например при няколкомесечни плъхове след лезии на латералня или вентромедиален PAG след приложен топлинен стрес (на предна лапичка) комбиниран със стрес от социална изолация се наблюдава понижение на SIA.

6.7.5. Хипоталамус (HT)

Още през 1978г. Rhodes и Liebeskind доказват мощния аналгетичния ефект при директното стимулиране на задния хипоталамус (tail-flick и hot-plate тестове) и ролята му в десцендентния път на болковата перцепция (Rhodes & Liebeskind, 1978).

Cunningham и съавт. (1986), Aimone и съавт. (1988), както и Lopez и съавт. (1991), описват подобен аналгетичен ефект при плъхове в резултат на директно стимулиране на преоптичната и латерална зона на хипоталамуса.

Едни от първите съобщения за пряка връзка между лезията в областта на nucleus arcuatus и последваща SIA при плъхове (четири дни след хирургичната интервенция) са на Millan и съавт. 1980. По-късни изследвания доказват запазване на SIA ефекта две седмици след хирургичната интервенция (Kelsey et al., 1986).

При модели на SIA, вследствие приложено плуване в студена вода при мишки и плъхове лезиите на ХТ значително понижават SIA. При други опити с лезии на паравентрикуларното ядро на ХТ при плъхове се съобщава за липса на аналгетичен отговор при модел на имобилизационен стрес (Fuchs & Melzack, 1996). Следователно, може да се обобщи, че резултатите свързани с третирането на ХТ, а именно чрез лезии в различни хипоталамични зони, оказват силен и често противоположен ефект спрямо SIA.

Директно въведени ренин и ангиотензин в НТ на плъхове ускорява латентния отговор спрямо болкови стимули, следствие на температурни и комбинирани с имобилизацията стрес-модели. Този ефект е свързан с антагонизъма спрямо ангиотензин II рецепторите (Haulica et al, 1986).

Химичната блокада на хипофизо-надбъбречната система чрез директното въвеждане на dexamethezone в nucleus paraventricularis на НТ при плъхове понижава SIA. Този факт подсказва за съществуването на *кортикостероид - зависима форма* на SIA медиирана от ХТ (Filaterov et al, 1995, 1996).

При други изследвания е показано, че окситоцинът по време на стрес-отговора, е в ниски нива при опити с мишки, подложени на плуване в студена вода и SIA се понижава (Bodnar et al., 1983; Bodnar et al., 2002).

Друг хормон, продуциран в НТ - вазопресин, при опити с i.p. инжектиране на хипертоничен разтвор, дава първоначални данни, че не повлиява SIA (McEwen, 1997). По-късни опити, обаче говорят за медииране на SIA при участието му в модел, включващ ограничаващ хранителен внос.

При модел на стрес, предизвикан от плуване в студена вода с плъхове се доказва, че невротензинът синтезиран в ХТ и участващ в освобождаването на лутеинизиращия хормон и на пролактина се повишава в зоните на латералния ХТ, както и в тези на медиалната преоптична област (Seta et al, 2001).

В друга серия от опити е показано, че мишки с генетично нарушена синтеза на невротензин, както и плъховете третирани с невротензин рецепторния антагонист SR48692 развиват SIA в условията на стрес (отнемане на вода) (Gui et al, 2004).

Тези данни дават широко поле за бъдещи изследвания, основани на факта, че стимулираната активност в различни зони на ХТ, както и по време на SIA се оказват важен стимул за отделянето на невропептиди.

6.7.6. Мозъчен ствол

Basbaum и Fields (1979) представят топографска карта на пътищата на невронална проекция от мозъчния ствол към гръбначния мозък като част от десцендентния път, инхибиращ болката. Една еферентна антиноцицептивна проекция на мезодиенцефална връзка на гръбначния мозък се оказва със съществена роля при стимулирана SIA (Peschanski & Mantyh, 1983).

Rhodes и Liebeskind (1978) показват, че стимулацията на претекталната област на мезодиенцефалната връзка на мозъчния ствол, предизвиква мощен аналгетичен ефект при tail-flick и hot-plate тестове.

Хипоталамусът дава информация към PAG или ростровентралната медула (RVM), структури с доказана съществена роля при ноцицептивната регулация (Aimone et al, 1988; Behbehani et al, 1982, 1988; Bouhassira et al, 1993, 1995).

Невроните в PAG обобщават информацията от няколко области - RVM, парабрахиално ядро и nucleus tractus solitarius (Lewis et al, 1980). RVM инхибира еферентната ноцицептивна трансмисия към гръбначния мозък. Тази функция се осъществява чрез опиоид-зависими механизми.

6.7.7. Гръбначен мозък

Ранни проучвания, основани на приложени лезии на гръбначния мозък дават основания да се мисли за една десцендентна инхибиция на SIA при footshock на предните лапи при плъхове. В този случай SIA е медиирана чрез дорзолатералния funiculus на гръбначния мозък, докато при footshock на задните лапи, медиирането е свързано посредством един супраспинален или независим интраспинален път (Basbaum & Fields, 1979; Watkins et al, 1982; Meagher, 1990).

При мишки с генетично дефектни рецептори за субстанция P (пептид, освобождаван в дорзалния рог на SC, в отговор на болкови стимули) развиват в значителна степен по-слаба аналгезия вследствие стрес с форсирано плуване комбиниран с tail-flick тест (De Felipe et al, 1998).

Невроналните клетки функционират като молекули привличащи и прикрепящи лимфоцити към дорзалния път на SC при един възпалителен процес. Инжектирането на антитяло срещу тези невронални клетки със свойства на адхезионни молекули по-късно доказват, че се променя SIA при модели на стрес следствие плуване в студена вода на плъхове (Hua et al, 2006).

6.8. Неврохимия на SIA

В основата на различията в механизмите на действие на SIA на дисцендентно улеснена или подтисната ноцицепция стои активирането на различни рецептори в сложната комбинация от различни интрацелуларни сигнални механизми на трансдукцията (Millan et al, 2003).

Невротрансмитери или невропептиди, които могат да улесняват, както и да инхибират ноцицепцията, включват serotonin (5-hydroxytryptamine), noradrenaline, dopamine, dynorphin, acetylcholine и nitric oxide. Някои от тях са с преобладаващо улесняващ ноцицепцията ефект, като например аминокиселините glutamate, histamine, cholecystokinin, melanocortin, както и простагландините. Невротрансмитери или невропептиди с преобладаващ инхибиращ ефект са GABA, glycine, vasopressin, oxytrocin, adenosine, ендогенните опиоиди, както и ендоканабиноиди (Zhang et al, 1982, 2003).

6.8.1. Медиация и модулация на SIA чрез опиоидната система

Опиоидната система медиира стрес-индуцираната аналгезия (Akil et al., 1986; Amit & Galina, 1986). Интересът към факторите предизвикващи болка (физически, емоционални), както и към отговорите на организма е от огромно значение.

От векове е известен и прилаган морфина като болкоуспокояващо средство. Първите опити за ендогенна опиоидна система и по-конкретно за ефектите на морфина са от 1970 г. когато се предизвиква освобождаването му чрез стимулация на

PAG (Akil et al, 1986). Изучаването на ендогенните опиоиди и техните рецептори се развива с бързи темпове (Akil et al, 1984).

Началните експерименти показват, че въведен налоксона блокира аналгетичния ефект на SIA (Akil et al, 1976b). Подобни са резултатите и при въвеждането му при плъхове, подложени на болка, вследствие електрически шок (Fanselow, 2000). Системното или интрацеребрално въвеждане на антагонисти на μ-, к или *∂*-опиоидни рецептори напълно атенюират SIA и FCA при плъхове (Butler et al, 2008).

Стрес-индуцираната аналгезия, инициирана чрез модел на форсирано ходене при плъхове, също се променя след прилагане на опиоид-рецепторен антагонист (Nakagawasai et al, 1999). Въвеждането на налоксон при плъхове с индуцирана чрез третиране с морфин промяна в обонятелното възприятие, отслабва аналгезията (McNally & Akil, 2001).

Други изследвания показват, че мишки с генетична липса на β-endorphin (прекурсорна молекула на propiomelanocortin) не повлиява SIA (Kieffer, 1999). Тези изследвания подсказват, че в сравнение с met-enkephalin, β-endorphin е с по-активна роля при SIA. Женски трансгенетични мишки с лисващи μ- или *∂*-опиоидни рецептори не повлияват SIA в резултат на фиксирано плуване при hot-plate теста (Contet et al, 2006).

Ендогенната опиоидна система е проучвана също така и в контекста на циркадните вариации при SIA, които при опитни мишки показват, че са свързани с колебания в освобождаването на ендогенните опиоиди (Puglisi et al, 1982). Ритъмни денонощни промени са демонстрирани в naloxone-обратима, топлинна (опиоидна) и naloxone-нечувствителна, студова (неопиоидна) SIA, вследствие на форсирано плуване – изявено при CF-1. Показано е, че максимално изявена SIA е през нощта (Kavaliers & Ossenkopp, 1988).

По-ранни изследвания също така доказват, че хипофизата, както и ЦНС синтезират опиоиди по време на SIA (Millan et al, 1980a,b; Lewis et al, 1980). Опиоидни рецептори модулират функцията на вентролатералния PAG по време на FCA (Helmstetter & Landeira-Fernandez, 1990). Директното въвеждане на naltrexone във вентролатералния PAG също отслабва аналгетичния ефект от експозицията на новородени плъхчета и съжителство с възрастни мъжки, комбинирана с топлинна стимулация (Wiedenmayer et al., 2000; Wiedenmayer & Barr, 2000).

Доказано е, че SIA индуцирана от социален конфликт е асоциирана с понижение на β-endorphin-подобната имунореактивност в PAG (Kulling et al, 1988). Показано е,

че съществуваща индивидуална разлика, проявяваща се при β-endorphin-подобна имунореактивност в PAG, корелираща с експресията на силна или слаба SIA (Kulling et al, 1988).

В други опити при плъхове FCA е потисната, когато се блокира синтезата на μ-опиоидните рецептори в ростралната вентромедиална медула чрез директната инфузия на обезболяващи олигодеоксинуклеотиди (Foo & Helmstetter, 2000).

Комбинацията на опиоид-рецепторни антагонисти за μ- и k-, μ- и ∂- или към всичките подвида рецептори, въведени интратекално, атенюират SIA при плъхове (Menendez et al, 1993).

В други изследвания е показано, че G-протеините чувствителни към коклюш-токсина и G-протеин, пречистващ калиевите канали се оказват есенциални медиатори на опиоид-медиираната SIA (Parolaro et al, 1991; Blednov et al, 2003).

Има доказателства, че антиноцицептивния ефект на опиодните рецептори при активиране може да е свързан с освобождаване на инхибиращата аминокиселина ГАМК, както и на стимулиране на възбуждащата аминокиселина glutamate (глутаминова киселина). Опиоид-индуцираната антиноцицепция например може да е свързана както с алтерация на освобождаването ГАМК/глутамат и/или модулирана чрез ГАМК/глутамат рецепторни лиганди в редица зони в мозъка, включващи RVM, PAG, таламуса и амигдалата, както и в гръбначния мозък (Gilbert & Franklin, 2002; Sun et al, 2003; Jia et al, 2004; Deyama et al, 2007).

6.8.2. Гама амино маслена киселина (ГАМК)

По-ранни, както и настоящи изследвания, дават основание да се смята, че ГАМК участва в повече от 4% от инхибиращите синаптични процеси в ЦНС на бозайниците (Bowery & Smart, 2006).

Известно е, че ГАМК модулира функцията на префронталния кортекс при заличаване на спомените и паметта за страх. Инжектирането на $ГАМК_A$ рецепторен агонист muscimol в областта на инфралимбичния префронтален кортекс усилва участването на страх, създаван от слухови стимули (Akirav et al, 2006). ГАМК играе важна роля в медиацията на антиноцицепцията, предизвикана от двете системи – опиоидна и ендоканабиноидна. Още през 1979г., Mantegazza и съавт. показват, че i.v. инжектиране на muscimol отслабва антиноцицептивния ефект на морфина.

Изследвания при които се прилагат различни ГАМК рецепторни агнисти (ГАМК $_A$: muscimol; ГАМК $_B$: backlofen) и антагонисти (ГАМК $_A$: bicuculline, picrotoxin; ГАМК $_B$: phaclofen, CGP 35348) подчертават ролята и на двата подтипа рецептори - ГАМК $_A$и ГАМК $_B$ за някои форми на безусловна SIA (Tokuyama et al, 1992).

Стрес-индуцирана аналгезия при плуване в студена вода (мишки) се изменя при въвеждане интратекално на ГАМК $_B$ рецепторен антагонист, picrotoxin и bicullin (Killian et al, 1995). Прецизната роля на рецепторните подвидове е двусмислена и зависима от вида на приложения и въздействащ стресор (Houston et al, 1997).

Проучванията за участието на ГАМК-ергичната медиация в безусловната SIA представляват също интерес. Има данни за участие на ГАМК при FCA (Harris and Westbrook, 1996). При системното въвеждане на benzodiazepine, midazolam, които усилват инхибиторния ефект на ГАМК спрямо ГАМК$_A$ рецепторите, уврежда FCA при модел на плъхове, подложени на комбинация от загряване на пода и формалинов тест (Harris & Westbrook, 1996). Директното въвеждане на бензодиазепини в базолатералната амигдала и вентролатералния PAG, също атенюира FCA у плъхове (Harris & Westbrook, 1995). Този факт, потвърждава ролята на ГАМК в тази зона на мозъка в медиацията на FCA. Опитите на Helmstetter и съавт. (1993) показват, че директното въвеждане на benzodiazepine, diazepam в амигдалата може да отслаби ефекта на FCA у плъхове.

6.8.3. Глутамат

Съвременни проучвания показват, че блокирането на N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) рецепторите води до антиноцицептивен ефект, чрез директна инфузия на MK-801 в CA1 област на хипокампуса (Al Amin et al, 2004). Доказано е, че глутамата модулира ноцицептивната трансмисия в PAG, посредством опиоид-зависещи механизми (Mao, 1999).

Има данни, че глутамата при SIA отслабва хипоалгезията (Cox & Westbrook, 1994). В тези опити авторите въвеждат MK-801 по време на тренировачната фаза, което подчертава значението на NMDA-рецепторите. Експресията на FCA не е нарушена при плъховете, но се медиира условният отговор.

Други опити демонстрират, че билатералната инфузия на NMDA-рецепторния антагоист d,1-2-amino-5-phosphonovaleric acid в базолатералната амигдала на плъх, отслабва FCA, когато се въвежда преди страх-задържащи модели (Lee et al, 2001).

При модел на форсирано ходене, системното инжектиране на LY-235959, конкурентен NMDA-рецепторен антагонист, атенюира SIA при формалин-инжектирани мишки на възраст от 4 до 24 седмици, но не и при мишки на възраст 48 седмици (Onodera et al, 2001).

Антиноцицепцията при hot-plate тест при мишки изложени на агресивна атака на нападения и хапане по между им се понижава след въвеждане на конкурентния NMDA-рецепторен антагонист NPC 1262 (Kavaliers, 1990). Този резултат е при опитни животни от мъжки пол. Следователно, ролята на глутамата и глутаматните рецептори в SIA е свързана и зависима от възрастовия и полов фактор.

6.8.4. Моноаминергична взаимовръзка със стрес-индуцирана аналгезия

Катехоламините като допамин, норадреналин, индоламините и серотонин пренадлежат към класа съединения, наречени моноамини, играещи съществена роля в модулацията на мозъчните функции.

Нивото на моноамините се нарушава в отговор на една ноцицептивна невротрансмисия (Millan et al., 1999, 2002). Моноаминергичните системи са с доказана намеса в невротрансмисията, свързана с чувството на отвращение (Millan et al., 2003). Голям брой допаминергични неврони, произхождащи от средния мозък, инервират мезолимбичната и мезокортикална системи.

В SIA модел при плъхове, представляващ комбинация от отдръпване на опашката при въздействие на гореща вода и footshock е отчетена повишена стойност на допамини, измерена в ХТ и префронталния кортекс (Rosecrans et al., 1986).

Повишението съотношение в PAG на допаминовия метаболит 3,4-dihydroxyphenylacetic acid и dopamine, както и редуцираните нива на допамина в таламуса са измерени при плъхове изложени на FCA (Finn et al., 2006; Ford et al., 2008).

Норадреналинът се освобождава по време на стрес при активация на locus coeruleus и се инхибира чрез активиране на $ГАМК_A$, $ГАМК_B$ и опиоидните рецептори (Fung & Fillenz, 1983).

Системното въвеждане на α_2-адренорецептори агонисти clonidine, потенциира SIA при стрес в резултат на плуване в студена вода с плъхове (Bodnar et al, 1983).

Други автори докладват за пролонгирана SIA у плъхове по време на tail-flick тест със системно въвеждане на α_1-адренорецепторен антагонист phonoxybenzamine (Snow et al., 1982).

Прилагането на NA-блокери директно в лумбосакралната корда, води до отслабване на SIA при модел с footshock на предните лапички, но не повлиява SiA или FCA при такъв, с ангажиране на задните лапички (Watkins et al., 1984).

6.8.5. Роля на хипоталамо-хипофизо-надбъбречната (HPA) ос в SIA

Роля на хипоталамо-хипофизо-надбъбречната ос е огромна в невроендокринния отговор на организма при стрес. Тя повлиява редица физиологични процеси като храносмилане, съхраняване на енергия, както и енергоразхода, емоции, зависимости и др. (Pacak et al., 1998; Lovallo, 2006) HPA се оказва, че също така играе роля в медиирането на SIA (Filaretov et al, 1996). Проведени са редица експерименти, доказващи участието на тази система в SIA – напр. хипофизектомия на плъхове, при което животните не развиват SIA, след приложен стрес с плуване в студена вода (Lapo et al., 2003).

Адреналектомията на мишки доказва ролята на ACTH в потенцирането на SIA (Panocka et al., 1987). В редица други опити е показано, че системното инжектиране на дексаментазон или i.v. въвеждане на хидрокортизон понижава SIA при плъхове (Filaretov et al, 1995). Селективно отгледани мишки, експресиращи норадреналин повишават SIA при стрес с форсирано плуване, в отличие от дексаметазон-атенюираната SIA (Panocka et al, 1987).

При друга форма на SIA, където има опиоид-медиирана компонента, наречена *„дълготраеща аналгезия”* в резултат на хеморагичен шок, аналгезията е блокирана от адреналектомия и възстановена от кортикостеронова терапия (Fukuda et al, 2001). Тези факти подчертават значението на кортикостерона за SIA.

7. Участие на азотния оксид при стрес-индуцираната аналгезия

Доказано е, че при стрес се активира HPA и при стрес-отговора основен регулатор е CRH. Доказани са физиологични и морфологични връзки между азотния

оксид и CRH (Nelson et al, 1997). Показано „съжителство” между NOS-позитивни клетки „стрес хормоните” окситоцин и вазопресин (McLeod et al, 2001).

Стресът е свързан със синтез на азотен оксид, катализиран от NOS. Мозъчната NO синтеза (nNOS) се открива в отделни популации неврони, които се възбуждат от глутамат чрез йонотропни NMDA рецептори, контролиращи Ca^{2+} канали. Такива неврони има в хипоталамуса на плъх и хора (McCann et al, 1988; Thorns et al, 1998). Известно е, че NO играе важна роля в регулацията на хипоталамичния портален кръвоток.

Стресът стимулира секрецията редица хормони, както медиатори и модулатори на възпалителния процес; вазопресин, ангиотензин II, цитокини и др. фактори, въздействащи пряко и индиректно върху активността на HPA. Описани са сложни връзки между IL-1 и NO, участващи в контрола на HPA. Всеки сигнал, включително IL-1, който активира глутаматергичните неврони може да предизвика едновременно освобождаване на NO и CRH (Holmes et al, 1986).

Двустранна е ролята на NO в повлияването на болката. От една страна той може да потенцира стимулиращия ефект на невроналния IL-1, водещ до увеличение либерацията на CRH, най-вероятно чрез цГМФ. От друга страна, NO може да подтиска свръхстимулацията на тази невронална верига чрез способността му да окислява редокс-сензитивния пункт на NMDA-рецептора и така да намали освобождаването на CRH и NO. По този начин NMDA рецепторите играят важна роля в контрола на HPA оста.

По литературни данни, глюкокортикоидите повишават експресията на глутаматните рецептори и предизвикват глутамат-медиираното възбуждане, инхибирайки обратния глутаматен захват (Kim J & Yoon K., 1998; Kim et al., 2002). Ако не съществуваше тази регулация на продукцията на периферните цитокини от глюкокортикоидите, свръхстимулацията на централните NMDA рецептори увеличаващи освобождаването на NO може да доведе и до токсичен ефект върху нервните клетки. Механизмите, по които глюкокортикоидите потенцират инхибиращия ефект на NO върху HPA не са добре проучени и изяснени. Възможно е модулацията на конститутивната NOS (cNOS) да е свързана с тях.

При експерименти, проведени на плъхове, се установява, че NO-системата отговаря на основните критерии за стрес-лимитираща система: активира се от стрес; може да лимитира освобождаването и/или продукцията на стрес-хормони; да регулира стрес-индуцираните увреждания в организма; екзогенно въведени

метаболити на тази система, например NO повишават, докато NOS-инхибиторите понижават резистентността, както и адаптивните способности на организма към стрес, освен това NO-системата се активира в процеса на адаптация към повтарящи се изменения в околната среда.

Едночасовата имобилизация повишава експрецията на nNOS mRNA, nNOS-позитивни неврони (Calzà. et al, 1993). Тези резултати предполагат, че NO е тясно свързан с регулацията на HPA. Дали действието му е индиректно чрез други невромодулатори или директно чрез неврони съдържащи едновременно CRH и NO, остава неясно. Имобилизацията не само активира продукцията на NO, но също така повлиява нивата на окситоцин и/или вазопресин в PVN у плъх (Shirakawa T. et al, 2004). Повишаване нивото на тези хормони в PVN се наблюдава също и при “forced swimming” стрес-индуциран у плъхове (Wotjak C. et al, 1998).

Данни за ролята на NO при ниски температури са оскъдни. Индуцируемата и ендотелна NOS в хипоталамуса участват най-вероятно в патологичните процеси на предизвикани от студовия стрес язви (Sun et al, 2003).

Азотният оксид е с доказана роля при лечението на гастрити и дуоденални язви. Известно е, че в отговор на студов стрес се активира NO в кафявата мастна тъкан и се наблюдава NO-зависимо повишаване на кръвотока в нея (Dixit et al, 1999).

Доказано, че повлияването на NO система с различни донори или инхибитори при студов стрес може да доведе до различни промени в терморегулаторните функции, нивото на мозъчните моноамини и нивото на CORT в кръвта (Gilinskii et al., 2005) .

Има данни и за тясна връзка на NO и SIA (Yamada et al, 1995; Esch et al, 2002; Bocheva & Dzambazova, 2008). Предварително третиран с L-NAME мъжки плъхове Wistar показват удължаване на tail-flick-задържането и закъсняване с реакциите на опитните животни; както и статистически достоверно потенциране на имобилизационна SIA.

Изследвани са ноцицептивните промени при остър и хроничен имобилизационен стрес след въвеждане на NO-прекурсорът нитроглицерин у плъхове (Costa et al., 1993). Установено е, че нитроглицеринът предизвиква хипералгезия. Острият стрес (90 min) има изразен аналгетичен ефект, който не се възстановява напълно от нитроглицерин.

NO-синтезата чрез cNOS, но не и чрез индуцибилната NOS (iNOS) е въвлечена в опиоид-зависимите стрес-индуциране противогърчови ефекти срещу електрически и PTZ-предизвикани гърчове (Homayoun et al, 2002).

Азотният оксид е тясно свързан със стрес-индуцираните заболявания (имунологични, сърдечно-съдови, невродегенеративни, ментални), от което произтича и необходимостта от изследване участието му при различни видове стрес.

Стресът, както и NO оказва увреждащо действие, което зависи от продължителността на отделянето му, количеството на продукцията и типа на синтезираните NO молекули. Освен това NO противодейства на норадреналиновата активност и симпатиковия отговор, инхибира освобождаването на моноаминнните трансмитерни молекули и тук също участват авторегулаторни пътища въвличащи различни сигнални молекули като опиати и ендоканабиноиди (Esch et al, 2002).

8. Участие на опиоидната система при стрес-индуцираната аналгезия

8.1. Мултиплени опиоидни пептиди (МОР)

Съвременните концепции за възникването, развитието и ефектите на стреса върху организма се основават на постиженията на физиологията, фармакологията и молекулярната биология в изучаването на ендогенните опиоиди пептиди (ЕОП).

Стресът и стрес-придружаващите емоции може да афектират не само нормалните функции на организма, но и да предизвикат дълготрайни алтерации в активността на редица опиоид-невронални системи, мозъчни функции; както и да засегне редица поведенчески реакции като моторна активност, μ-поносимост, апетит и хранене, сексуалност и т.н. Някои от тези стрес отговори могат да бъдат усилени или антагонизирани от антагонисти на опиоидните рецептори.

Известни са редица данни за включване на ЕОП в стрес-ефектите при кръвното налягане и в патогенезата на хипертонията. По-късни резултати посочват участието им в повлияването на имунната система, чието увреждане се осъществява чрез взаимни връзки между централни опиоид-ергични пътища, невроендокринна система и ЦНС. Съвременни проучвания насочват към доказателства за медииране на имунния отговор чрез рецептори за ЕОП по повърхността на имунокомпетентните клетки.

Известно е, че ендогенните опиоиди пептиди произхожда от различни протеин-прекурсори: POMC, prodymorphin (PDYM) и proenkephalin (PENK). По-нататъшните проучвания разкриват тяхната телесна и мозъчна дистрибуция, характеристика, ефекти. Оказва се, че основните групи, произхождащи от PENK, PDYN и POMC са енкефалини, динорфини и ß-ендорфини. Както бе отбелязано в предишна глава на обзора, PENK е източник за Met- и Leu-enkephalins и за някои по-дълги пептиди ЕОП като dynorphin A, dynorphin B, α- и ß-neoendorphin, както и някои по-широки молекули могат да бъдат генерирани от PDYN.

POMC е прекурсорът на ß-endorphin, α-endorphin и някои неопиоидни пептиди. Съществува нова група пептиди, открити в мозъка, наречени ендоморфини – endomorphin – 1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-Nh_2) и endomorphin – 2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH_2). Те притежават уникална структурна характеристика, проявяващи висока селективност към опиоидните рецептори (MOP) (Zadina et al, 1997).

Невроните, съдържащи ЕОП присъстват в области и системи, включващи се в стрес-отговора – като хипоталамус, хипофиза и надбъбречни жлези. Важно е да се отбележи, че болшинството от ЕОП не са тонично активни и подобно на опиоидните антагонисти оказват слаб или никакъв ефект върху условията на хомеостаза.

ЕОП са тясно свързани с класическите стрес-хормони като ACTH, CRH и адреналин. ACTH и ß-endorphin се произвеждат от един и същ прохормон - POMC и се секретират от хипофизарните кортикотрофи и неврони в мозъка. Подобно взаимоосвобождаване се наблюдава и при адреналина и енкефалините от надбъбречните жлези; докато динорфините се складират съвместно с CRH в хипоталамичните неврони.

8.2. Опиоидни рецептори – подвидове и техните лиганди

Три от представителите на семейството на опиоидните рецептори са клонирани още през 1990 г. с μ-опиоидния рецептор; с последвал MOP и к-опиоиден рецептор (KOP). Тези три рецептори принадлежат към седем-трансмембранни G-proteins – двойно-свързани рецептори и проявяват екстензивна структурна хомоложност. Съществува афинитет на ЕОП към различни опиоидни рецептори.

MOP рецептор (морфин-подобен рецептор) и ендоморфините се явяват техни ендогенни опиоиди (Okada et al., 2003) обобщават данните за MOP-рецепторите, техния афинитет към OP, както и към други опиоидомиметици.

Енкефалините се свързват с голям афинитет с DOP рецептори и по този начин се оказват ендогенни DOP-рецепторни агонисти. Подобен афинитет към MOP и DOP-рецепторите демонстрира и ß-ендорфина.

Динорфините, свързани с KOP – рецептори функционират като техни ендогенни лиганди. Някои от подвидовете на опиоидните рецептори – MOP1, MOP2; DOP1, DOP2; и KOP1, KOP2, KOP3 са от особен интерес по отношение на редица фармакологични изследвания. Интересен е фактът, че са потвърдени и алтернативни подвидове на MOP рецептори и при мишки, плъхове и при човек (Pan et al., 2007).

Интензивният напредък в генетичните изследвания в последно време показват, че индивидите, носители на едно или две копия на 118G MOP рецепторен алел може да се окажат с повишен риск към опиатна и алкохолна зависимост (Lovallo et al., 2006; Lerieche, 2010). Предполага се, че при увреден MOP рецепторен алел, кодиращ високо чувствителен такъв съществува по-голяма ранимост и чувствителност при стрес – въздействия, както и по-голяма склонност да развият зависимост при различни стрес-ситуации.

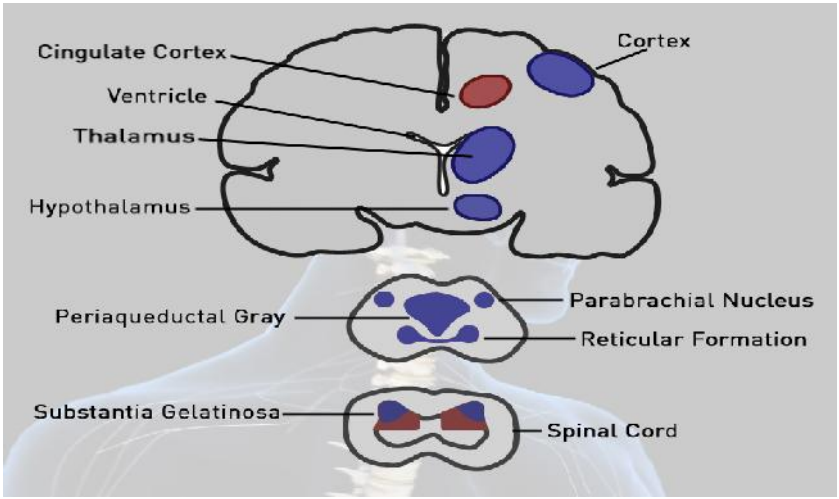
Фармакологичната характеристика и на KOP също е показала функционална значимост. Например, два от подвидовете KOP – KOP1 и KOP2 се оказват модулатори на допамин и ацетилхолинергично освобождаване в неостриатума при плъхове.

8.3. Разпределение на опиоидните пептиди и рецептори

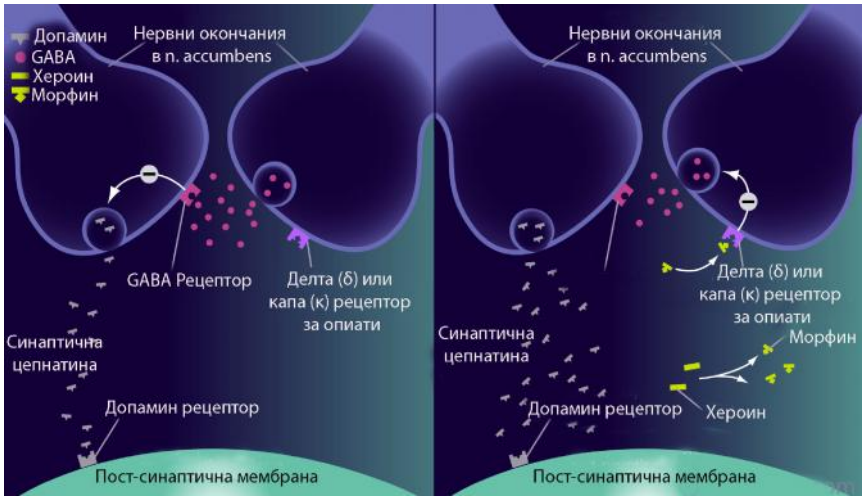
Свързаните с β-Endorphin пептиди присъстват в nucleus arcuatus на отношение към стрес-отговора, както и в лимбичните и raphe-ядра и ventral tegmental медиобазалния ХТ (Lerieche et al., 2010). В допълнение някои от тези структури могат да бъдат инервирани чрез POMC неврони, локализирани в ядра на солитарния тракт (NTS) на каудалната медула.

Ендокринни клетки от междинния дял на хипофизата, клетки от периферни тъкани и имуноцити съдържат, синтезират и освобождават POMC пептиди. Тези системи са включени в периферното звено на стрес отговора. Съвременни изследвания отчитат ролята на POMK-пептидите, секретирани от мастоцитите в кожата, при опит за регулация на стреса, в случаите на стрес-индуциран от фактори (стресори) от околната среда (Slominski et al, 2011).

PENK-невроните са широко разпространени както в централната така и в периферната нервна система. Неврони на тази система са открити в гръбначния мозък, краниалните сензорни системи и по този начин вземат участие в болка-сигнализиращите сигнали и отговори на тези стимули. Представителство на PENK-съдържащи клетки съществуващи и в адреналната медула.



Фиг. 10. Опиоидни рецептори - общо разпределение в нервната система



Фиг. 11. Обобщена схема за опиоидни рецептори

PDYN-невроните са широко разпределени в мозъчни полета, асоциирани със стреса. Динорфинът и свързаните пептиди присъстват в магноцелуларните неврони на PVN на ХТ, където са складирани съвместно с вазопресина, а също така и в NTS, в полета, свързани с регулацията на вагуса и на други автономни функции. По-късно се установява, че неврони има и в лимбичната система и в зони на гръбначния мозък, включващи се в трансмисията на ноцицептивните стимули. Окончанията на тези

неврони са локализирани в задния хипоталамус и в надбъбречните жлези, предимно в кората им (Фиг. 10, 11).

Ендоморфините са ендогенни пептиди, изолирани през последните 20 години от говежди и човешки мозък (Zadina et al, 1992; Hackler et al, 1995). Тези пептиди се различават от другите ЕОП, при които след Tyr-остатъците следва Gly. За тях е известно, че те по-скоро са свързани с по-рано откритите опиоидни пептиди, съдържащи Tyr-Pro остатъци, така например - morphiceptine, hemorphine и casomorphine. Доказано е, че ендорфините са ендогенни лиганди за МОР рецепторите, което подчертава, че те са важни модулатори на болковия и стрес-отговора за автономната и невро-ендокринна система (Kastin et al., 2002; Wang et al., 2002; Silverman et al., 2005).

Широкото разпространение на ендоморфините и тяхната колокализация със субстанция Р, калцитонин ген-свързания пептид и МОР рецепторите на първичните аферентни неврони предполага тяхната роля в модулацията на болковата трансмисия (Greenwell et al, 2007).

Продължават интензивните проучвания, свързани със стрес-отговора и участващите опиоидни системи, които променят хода на процесите, хомеостазата в организма и в крайна сметка се наблюдават патологични усложнения, касаещи физическото и психично здраве.

От направеният литературен обзор следват следните изводи:

1. Аминокиселините канаванин, орнитин и цитрулин притежават аналгетична активност.
2. Канаванинът е инхибитор на азотноокисната синтаза.
3. Ендогенният пептид Tyr-MIF-1 има аналгетични и антистресорни ефекти.
4. Логично е да се търсят аналози на Tyr-MIF-1, в чиято молекулата са инкорпорирани аминокиселини от цикъла на уреята - орнитин, цитрулин, както и канаванин и каналин.
5. В литературата до този момент не намерихме данни за ефектите на новосинтезираните аналози на Tyr-MIF-1 върху болковата перцепция, както за ефектите им при различни видове стрес
6. Няма дани за участието на опиоид- и азотноокисната системи в аналгезията, както и при стрес.
7. Няма данни и за ефектите на новосинтезираните пептиди върху експресията и разпределението на nNOS u NADPH-d реактивните неврони в PAG.

ЦЕЛ и ЗАДАЧИ

ЦЕЛТА на настоящия труд е да се изследват аналгетичните ефектите на новосинтезираните аналози на Tyr-MIF-1; Tyr-Orn-MIF-1, Tyr-Cit-MIF-1, Tyr-Cav-MIF-1, Tyr-Can-MIF-1. А на аналозите, показали най-силен аналгетичен ефект - Tyr-Cit-MIF-1, Tyr-Cav-MIF-1 да се изучат ефектите върху имобилизационна и студова стрес-индуцирана аналгезия; участието на опиоидната, азотноокисната система; да се изследват ефектите на Tyr-Cit-MIF-1, Tyr-Cav-MIF-1 върху локализацията и експресията на азотноокисната синтаза (NOS) в periaqeductal gray (PAG).

За изпълнението на тази цел, бяха поставени следните **ЗАДАЧИ**:

1. Да се изследва базалната ноцицепция:
- при контролни групи животни;
- след инжектиране с Tyr-Orn-MIF-1, Tyr-Cit-MIF-1, Tyr-Cav-MIF-1, Tyr-Can-MIF-1 върху интактни животни;

2. Да се изследват ефектите на аналозите, показали най-силен аналгетичен ефект Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 върху имобилизационн, студова и топлинна стрес-индуцирана аналгезия;

3. Да се изследва участието на опиоидергичната система:
- в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 в интакти животни;
- в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 при имобилизационна и студова стрес-индуцирана аналгезия;

4. Да се изследва участието на азотноокисната система:
- в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 при имобилизационна, студова и топлинна стрес-индуцирана аналгезия;

5. Да се изследват ефектите на Tyr-Cit-MIF-1, Tyr-Cav-MIF-1 върху:
- азотноокисната синтаза (NOS) в periaqeductal grey (PAG).

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Екпериментите бяха проведени върху 424 мъжки бели плъха линия Wistar с тегло (180-200g). Животните бяха отглеждани при нормални условия - при температура 22 ± 2^{o}C, със свободен достъп на храна и вода. Светлината бе с регулиран цикъл: 12 часа светло/12 часа тъмно.

Всички опити бяха проведени между 9.00 и 12.00 ч. и бяха извършени съгласно изискванията на Международната Асоциация за изследване на болката (Zimmermann M., 1983) и ЕКНМ към МУ-София.

I. ***In vivo*** методи

1. Ноцицептивни тестове

1.1. Метод с прилагане на механично дразнене - *Paw pressure (PP) test*

Промените в болковата активност се измерват с аналгезиметър Ugo Basille. Прилага се натиск върху задната лапа на плъх, която е поставената под "острието" на аналгезиметъра с постепенно увеличаващ се натиск (до 500 гр.). Степента на аналгезия се отчита по специфична двигателна реакция на животното, която се състои в отдръпване на лапката при достигане на болков праг. Отчитат се относителни единици съгласно скалата на апарата (Randall-Selitto, 1957) (Снимка 1).

1.2. Метод с прилагане на термично дразнене - *Hot plate (HP) test*

Термичен ноцицептивен стимул (55^{o}C ± 1^{o}C) се прилага върху лапите на свободно подвижни животни. Ноцицептивния праг бе верифициран като латентност от началния момент на прилагане на ноцицептивния стимул, до момента на реакция на животното (обикновено изразявана в близане на лапите и скокове), показваща начало на болково усещане. Отчитането на времето става в секунди. Cut off – 30 sec. (Снимка 2).

2. Модели на стрес

2.1. ***Имобилизационен стрес*** - животните се поставяха за 1 час в специални прозрачни пластмасови цилиндри с отвори за дишане, ограничаващи до минимум движенията им (Снимка 3).

2.2**. *Студов стрес* -** животните се поставяха в хладилна камера при температура 4° С за 1 час.

2.3. ***Топлинен стрес*** - животните се поставяха в топленна камера при температура 38° С за 1 час.

Снимка 1. Метод с прилагане на механично дразнене - Paw pressure test.

Снимка 2. Метод с прилагане на термично дразнене - Hot plate test.

Снимка 3. Модел на имобилизационен стрес.

<u>ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛИ:</u>

За ноцицептивните методи: Животните бяха разпределени в групи по 6. Всички вещества бяха разтворени в 0.9%-разтвор на NaCl и въвеждани интраперитонеално (i.p.) След направена доза отговор-крива, бе избрана доза от 1 mg/kg за изследваните новасинтезирани пептиди Tyr-Cit-MIF-1, Tyr-Cav-MIF-1: 1.) в интактни животни; 2.) веднага след стрес процедурата; 3.) след стрес и 20 мин. след Naloxone hydrochloride dehydrate (Nal, 1 mg/kg), L-N ^{G}-Nitro-Arginine Methyl Ester (L-NAME, 10 mg/kg) или L-Arginine (L-Arg, 1 mg/kg), Methylene blue (MB, 500µg/rat), SIN-1, 0,2 mg/kg, i.p.).

Контролната група бе инжектирана с физиологичен разтвор 1 ml/kg. Ноцицептивните измервания започваха веднага след стрес или 15 мин след инжектиране на пептидите.

II. ***In vitro*** методи

Хистохимично оцветяване: След анестезия с тиопентал (40 mg/kg, i.p.) експерименталните животни по три от всяка група бяха перфузирани транскардиално с 4% разтвор на параформалдехид в 0.1 М фосфатен буфер с pH 7.2-7.4. Мозъците се изваждаха и оставяха за постфиксация в същия разтвор, 1 час на стайна температура. След неколкократно промиване в 0.1 М фосфатен буфер, pH 7.4, материалът се оставяше в буфер и оставяше да пренощува при температура 4°C. Серийни срези се

приготвяха на замразяващ микротом (Reihart-Jung), като всеки седми срез с дебелина 40 μm се използваше при изследването.

Хистохимия: Част от срезите бяха използвани за хистохимично оцветяване, при което се използва NADPH-diaphorase (NADPH-d) като маркер за актиността на NOS (Scherer-Singler et al. 1983).

Имунохистохимия: За имунохистохимично определяне на NOS бяха използван белязани антитела. За количествено измерване на плътността на NOS-имунореактивни неврони бе използвана система за микроанализ Olympus CUE2.

ИМУНОЦИТОХИМИЧНИ ПРОЦЕДУРИ

1. Серийните коронарни срезове 40 um freezing microtome (Reichert-Jung) at бяха поставяни в разтвори с моноклоналното антитяло - анти-NOS (Santa Cruz). **2**.Вторични антитела и маркиращи субстанции и нормални серуми: а. *Биотинилиран анти-миши IgG*, получен у кон (Santa Cruz), б *Авидин-биотин-пероксидаза* кит ABC (Santa Cruz). **3**. *3,3'-Диаминобензидин (ДАБ)* (Sigma). 4. *нормален кози серум* (Sigma).

Контроли*:*

1. Пропускане на инкубацията в първото антитяло; 2. пропускане на инкубацията във вторичното антитяло; 3. пропускане на първичното и вторичното антитяло.

Контролите се проведоха с цел изключване на кръстосана реактивност и неимунологични взаимодействия, които биха опорочили получените резултати.

Във всички случаи контролите показаха отрицателни резултати, което е задължително условие за правилната интерпретация и обсъждане на получените данни.

Микроскопски анализ: Количествните данни за плътност на невроните бяха получени с помощта на компютърен образен анализатор Olympus-CUE2.

Статистическа обработка: Експерименталните данни са обработени с ANOVA, при ниво на достоверност $p<0.05$. Получените резултати са представени като средноаритметични стойности и стандартните им грешки ($x \pm SEM$).

Количествени изследвания: Количествните данни за плътност на невроните и размерите на невроналните тела бяха получени с помощта на компютърен образен анализатор Olympus-CUE2. Получените данни се представяха средните стойности и се сравняваха с помощта на Student t-тест.

РЕЗУЛТАТИ

I. ИЗУЧАВАНЕ АНАЛГЕТИЧНИТЕ ЕФЕКТИ НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ АНАЛОЗИ НА TYR-MIF-1

Аналгетичните ефекти на новосинтезираните аналози на Tyr-MIF-1 бяха изучени посредством тестове въвличащи механо- и терморецепторите.

Изучаване биологичните ефекти на новосинтезираните аналози на Tyr-MIF-1 **(**Tyr-Orn-MIF-1, Tyr-Cit-MIF-1, Tyr-Cav-MIF-1 Tyr-Can-MIF-1**)** са продължение на предишни изследвания относно връзката структура-действие по отношение на влиянието на страничната верига на аминокиселините в позиция **3** - нейната дължина, разклоненост и полярност.

Новосинтезираните аналози на Tyr-MIF-1 бяха синтезирани от колектив ръководен от Академик Евгени Головински, Институт по Молекулярна Биология, БАН.

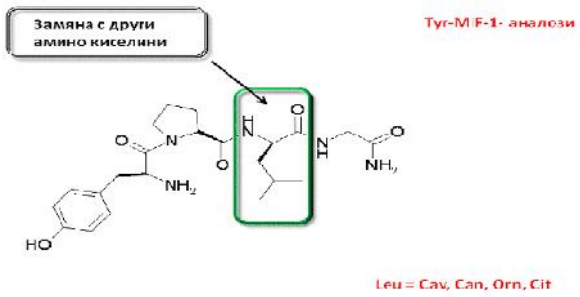
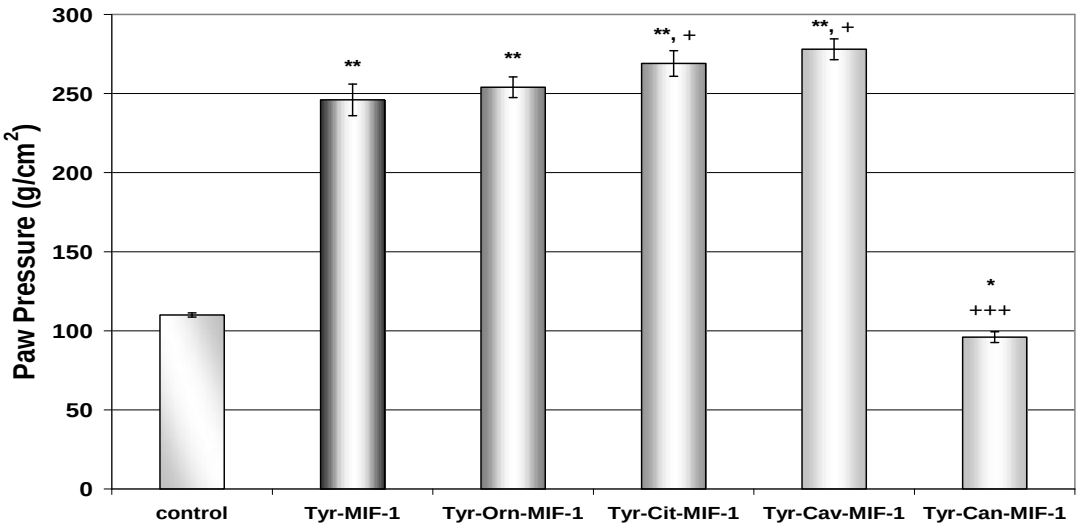


Схема 1. Дизайн за синтез на структурни аналози на Tyr-MIF-1.

Пептидните аналози са модифицирани чрез замяната на Leu-остатък в трета позиция с непротеиногенни аминокиселини (АК), участващи в цикъла на карбамида - канаванин (Cav), орнитин (Orn), каналин (Can) и цитрулин (Cit).

Tyr-Orn-MIF-1, Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 (в доза 1 mg/kg, i.p.) показаха аналгетични ефекти ($p < 0.01$) в сравнение с този на контролната група.

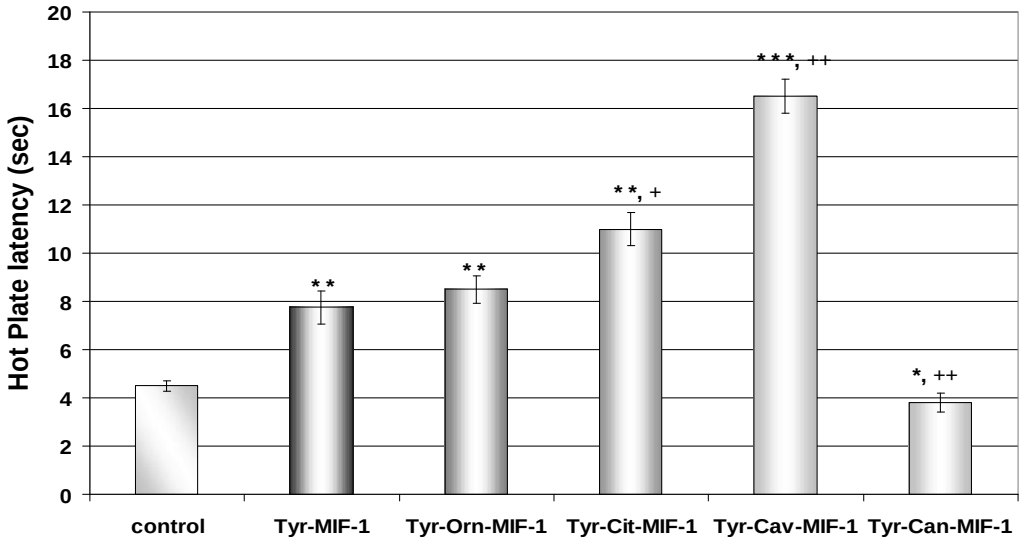
От новосинтезираните четири аналози само Tyr-Cit-MIF-1 ($p < 0.05$) и Tyr-Cav-MIF-1 ($p<0.05$) показаха статистически достоверно повишаване на болковия праг спрямо Tyr-MIF-1, новосинтезираният Tyr-Can-MIF-1 снижи статистически достоверно ($p < 0.05$) болковия праг спрямо контролата и Tyr-MIF-1 при PP-теста (Фиг. 1).



Фиг. 1. *Ефекти на Tyr-Orn-MIF-1, Tyr-Cit-MIF-1 Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Can-MIF-1 (доза 1 mg/kg, i.p.) върху болковия праг при PP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола; $^{+}$P<0.05, $^{+++}$P<0.001 спрямо Tyr-MIF-1.*

При HP-теста беше наблюдавано статистически достоверно увеличение на HP-латентността т.е. наличие на аналгетични ефекти за Tyr-Orn-MIF-1 ($p < 0.01$), Tyr-Cit-MIF-1 ($p < 0.01$) и Tyr-Cav-MIF-1 ($p<0.001$) в сравнение с контролната група. HP-латентността за Tyr-Can-MIF-1 беше намалена спрямо тази при контролните групи.

Двата новосинтезирани аналози Tyr-Cit-MIF-1 ($p < 0.05$) и Tyr-Cav-MIF-1 ($p< 0.01$) показаха статистически достоверно удължаване на HP-латентността в сравнение с тази на Tyr-MIF-1 (Фиг.2).



Фиг. 2. *Ефекти на Tyr-Orn-MIF-1, Tyr-Cit-MIF-1, Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Can-MIF-1 (всички в доза 1 mg/kg, i.p.) върху HP-латентността при HP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 спрямо контрола; $^{+}$P<0.05, $^{++}$P<0.01 спрямо Tyr-MIF-1.*

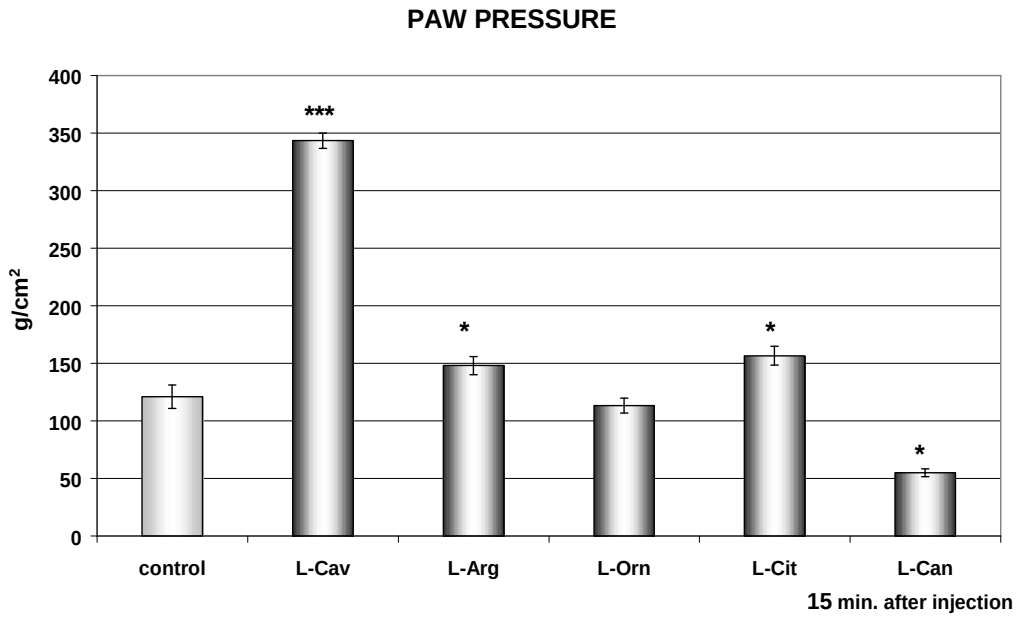
Литературните данни показват, че аминокиселите L-canavanine, L-ornitine, L-citruline притежават аналгетични ефекти, докато L-canaline реверсира болковата реакция до хипералгезия (Bocheva et al., 2005).

Относно канаванина е известно, че е природна аминокарбоксилова киселина от растителен произход. Той е структурен-аналог и ефективен антиметаболит на L-arginine в молекулата на който метиленовата група от страничната верига е заменена с кислороден атом (Rosenthal, 1972). Изместващи аргинина от неговия метаболитен цикъл (цикъла на орнитин-карбамида) под действието на ензима аргиназа, канаванинът се хидролизира до каналин и карбамид и този цикъл е наречен от Rosenthal цикъл на каналин-карбамида.

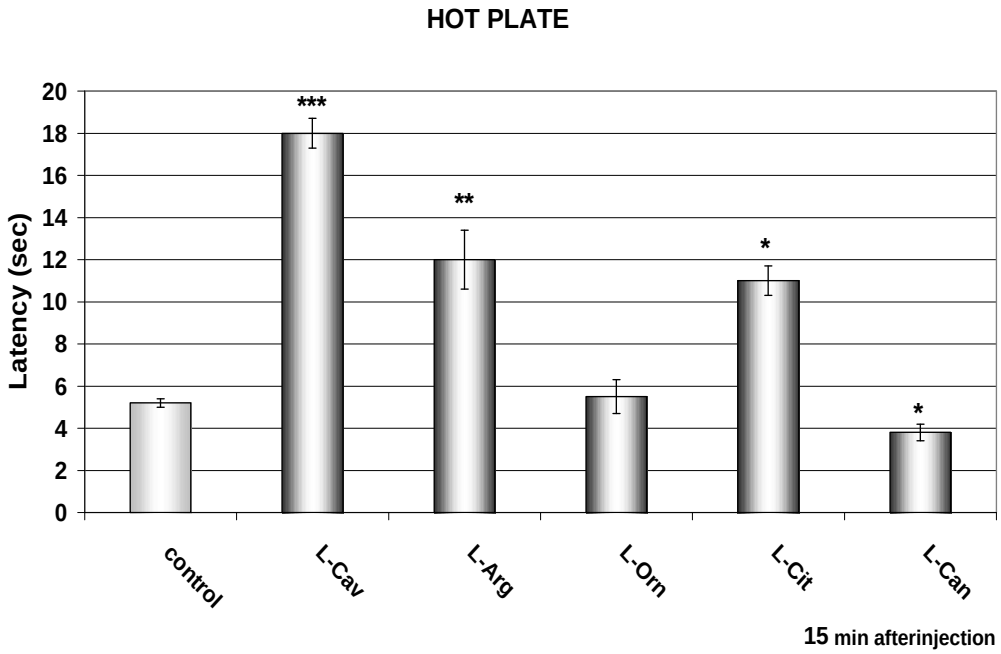
Орнитина (L-ornitine) е метаболит на аргинина и предизвиква аналгезия чрез киоторфиновите рецептори (Kawabata A., 1994a).

Каналинът (α-амино-γ-аминооксимаслена киселина, Can) е четирикратно по-токсичен от канаванина и е структурен аналог на орнитина.

Най-силен антиноцицептивен ефект притежава L-canavanine, следван от L-citruline и L-ornitine.



Фиг. 3. *Ефекти на L-Cav, L-arg, L-Orn, L-Cit и L-Can (всички в доза 1 mg/kg, i.p.) върху болковия праг при PP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола; $^{+}$P<0.05, $^{+++}$P<0.001 спрямо Tyr-MIF-1.*



Фиг. 4. *Ефекти на L-Cav, L-arg, L-Orn, L-Cit и L-Can (всички в доза 1 mg/kg, i.p.) върху HP-латентността при HP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 спрямо контрола; $^{+}$P<0.05, $^{++}$P<0.01 спрямо Tyr-MIF-1.*

Канаваниновата субституция в молекулата на късоверижният пептид (киоторфин) понижи аналгетичната му активност в сравнение с тази на киоторфина (Bocheva et al., 2003).

С удължаване на пептидната верига при субституция на канаванина в молекулата на трипептида MIF-1 се наблюдава повишаване на аналгетичния ефект, който е налоксон-обратим (Bocheva et al., 2003).

При субституиране на канаванина в молекулата на тетрапептида Tyr-MIF-1 се наблюдава повишаване на аналгетичния ефект сравнен с този на Tyr-MIF-1.

От друга страна Tyr-Cav-MIF-1 има по-силен аналгетичен ефект в сравнение с аналгетичните ефекти на пептидите, при които канаванина е инкорпориран в молекулата на киоторфина и трипептида MIF-1 (Bocheva et al., 2003).

Получените резултати потвъжрдават хипотезата ни, че инкорпорирането на горе-описаните аминокиселини в молекулата на Tyr-MIF-1 повишава болковия праг и HP-латентността.

На практика, аналгетичните ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 и при двата използвани теста са статистически достоверно по-високи от тези на Tyr-MIF-1.

При сравняване ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 с тези на аминокиселините L-canavanine и L-citruline, прави впечетление, че ефектите на

аминокиселините са значително по-висиоки от тези на двата новосинтезирани аналози (Bocheva et al., 2003).

***Заключение**:*

- *Инкорпорирането на аминокиселините в молекулата на тетрапептида Tyr-MIF-1 повиши аналгетичният ефект на новосинтезираните пептиди в сравнение с този на Tyr-MIF-1 при двата използвани теста;*
- *Аналгетичните ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 са по-ниски от тези на аминокиселини L-Cit и L-Cav и при двата използвани теста.*

II. ИЗУЧАВАНЕ АНАЛГЕТИЧНИ ЕФЕКТИ И МЕХАНИЗМИ НА ДЕЙСТВИЕ НА TYR-CIT-MIF-1, TYR-CAV-MIF-1 ПРИ ИМОБИЛИЗАЦИОННА СТРЕС ИНДУЦИРАНА АНАЛГЕЗИЯ

Известно, че стресът предизвиква отделяне на опиоидни пептиди, водещи до антиноцицептивни ефекти (Inoue et al., 2003). Аналгезията в резултат от стреса е феномен, наречен стрес-индуцирана аналгезия. Тя е свързана както с болковата перцепция, така и с модулацията на поведенческите отговори. Стрес-индуцираната аналгезия се наблюдава при различни видове животни, както може да бъде предизвикана от различни стресори – имобилизация, ниска или висока температура, социални стресори (Teskey et al., 1984; Kavaliers, 1990).

1. Изучаване участието на опиоидергичната система в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 при имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия

За да изясним участието на опиоидергичната система в аналгетичните ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 налоксонът (1 mg/kg, i.p.) беше въвеждан в интактни животни 20 мин преди инжектиране на пептидите. Изследванията започваха 15 минути след въвеждане на пептидите.

Получените резултати показаха, че Tyr-Cit-MIF-1 статистически достоверно ($p<0.01$) понижи болковия праг при PP-теста и HP-латентността при HP-теста в

сравнение с животните подложени на едночасов имобилизационен стрес на 15 и 30 минути от изследването (Фиг. 5 и 6).

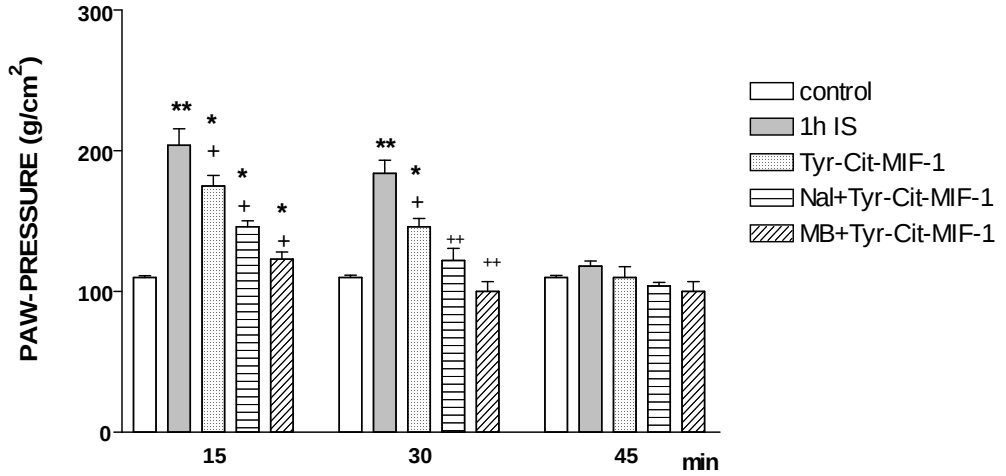
Tyr-Cav-MIF-1 статистически достоверно ($p<0.01$) понижи болковия праг при PP-теста, както и HP-латентността при HP-теста на 15 и 30 минути от изследването в сравнение с животните подложени на едночасов имобилизационен стрес (Фиг. 7 и Фиг. 8).

Ефектът на Tyr-Cav-MIF-1 започва от 15 мин. и е по-силно изразен на 30 мин. от изследването в сравнение с този на Tyr-Cit-MIF-1 при двата теста (Фиг.5 и 6 и Фиг.7 и 8).

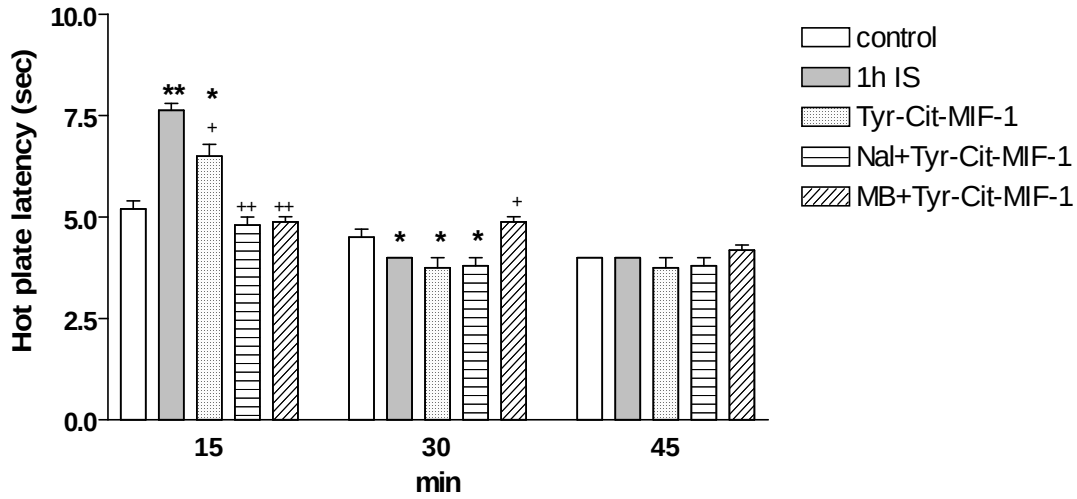
И двата новосинтезирани аналози на Tyr-MIF-1 понижават статистически достоверно болковия праг (PP-теста) и HP-латентността (HP-теста) в сравнение с животните подложени на имобилизационен стрес (Фиг. 5 и 6 и Фиг. 7 и 8).

Получените резултати показаха, че 1 часовия имобилизационен стрес (1h IS) статистически достоверно повиши в сравнение с контролата болковия праг при PP теста на 15 ($p<0.01$) и 30 мин ($p<0.01$) от изследването (Фиг. 5.).

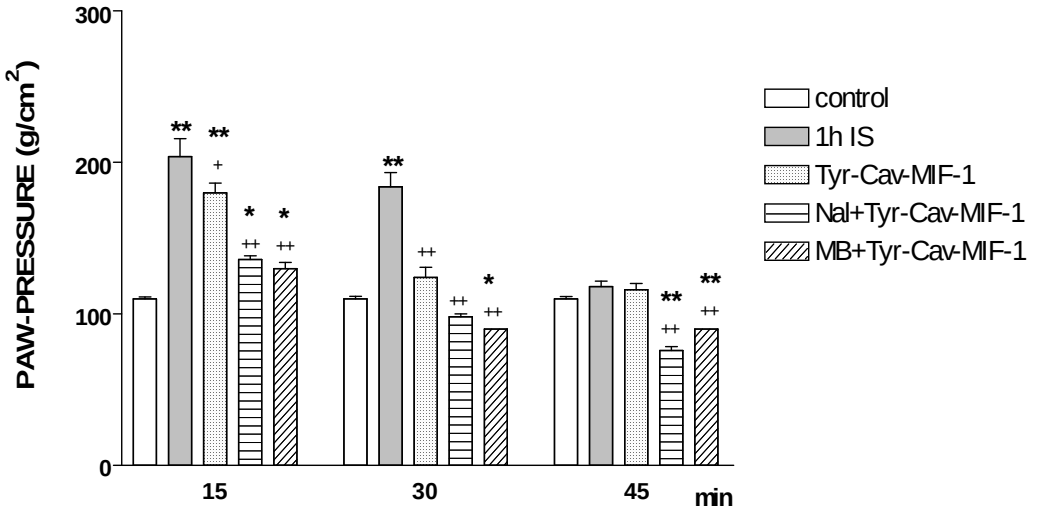
При HP-теста животните подложени на 1h IS показаха статистически удължен латентен период на 15 мин. ($p<0.01$) в сравнение с контролата (Фиг. 6).



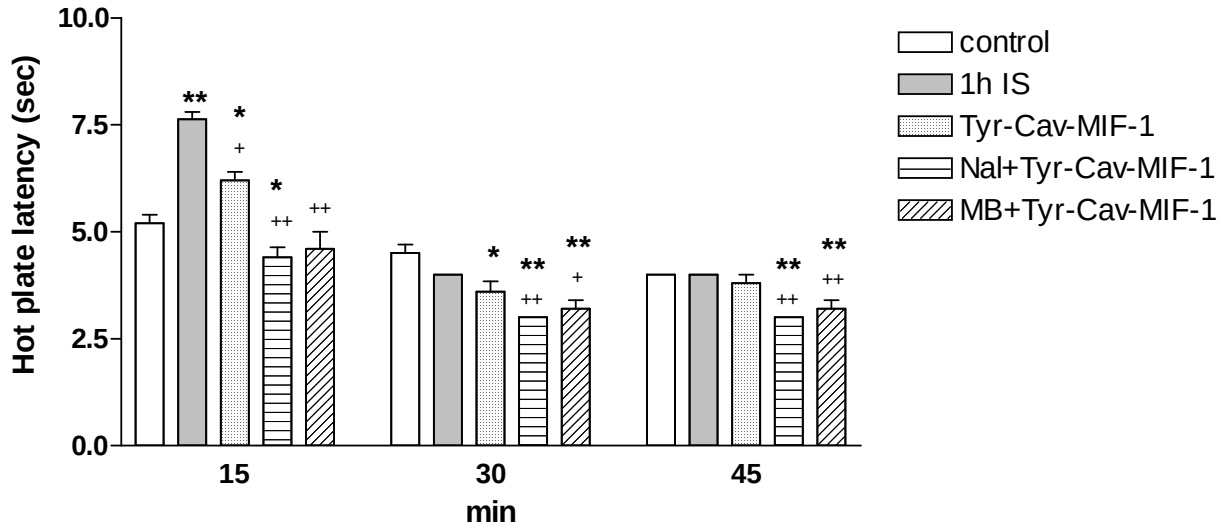
Фиг. 5. *Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 и съвместното му въвеждане с налоксон (Nal)(всички в доза 1 mg/kg, i.p.) и метилен блу (MB)(500µg/rat) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия (1h IS) в PP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола; $^{+}$P<0.05, $^{++}$P<0.01 спрямо 1h IS.*



Фиг.6. *Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 и съвместното му въвеждане с налоксон (Nal)(всички в доза 1 mg/kg, i.p.) и метилен блу (MB)(500µg/rat) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия (1h IS) в HP тест. Данните са представени като средни стойности* ï *S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола;* $^{+}P<0.05$; $^{++}P<0.01$ *спрямо 1h IS.*



Фиг. 7. *Ефекти на Tyr-Cav-MIF-1 и съвместното му въвеждане с налоксон (Nal)(всички в доза 1 mg/kg, i.p.) и метилен блу (MB)(500µg/rat) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия (1h IS) в PP тест. Данните са представени като средни стойности* ï *S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола;* $^{+}P<0.05$, $^{++}P<0.01$ *спрямо 1h IS.*



Фиг. 8. *Ефекти на Tyr-Cav-MIF-1 и съвместното му въвеждане с налоксон (Nal)(всички в доза 1 mg/kg, i.p.) и метилен блу (MB)(500µg/rat) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия (1h IS) в HP тест. Данните са представени като средни стойности* ï *S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола;* $^{+}P<0.05$; $^{++}P<0.01$ *спрямо 1h IS.*

Литературните данни сочат, че IS предизвиква повишаване на латентния период при tail-flick (Aloisi et al., 1998), hot-plate (Amir & Amit, 1978; Appelbaum & Holtzman, 1985). Това е така, тъй като е известно, че при 1 часов имобилизационен стрес ендогенните опиоидни пептиди частично са въвлечени в стресовия отговор. Те потискат норадреналиновия turnover в мозъка на плъх в хипоталамуса и амигдалата. В началните фази на стреса мет-енкефалина има най-висок ефект (Tsuda et al., 1989).

Относно стрес-индуцираната аналгезия е известно, че тя е категоризирана на: опиоидна и неопиоидна. През последните години някои автори говорят за т. нар. смесена SIA, която съдържа опиоидна и неопиоидна компоненти, които са в различно съотношение (Tsuda et al., 1989; Pacák K, Palkovits, 2001; Inoue et al., 2003; Bocheva & Dzambazova, 2008, Bocheva & Dzambazova-Maximova, 2009).

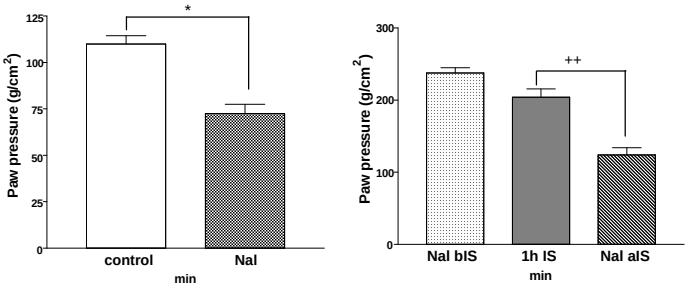
Налоксонът или налтрексон реверсират опиоидната компонента, докато не-опиоидната не е чувствителна към тези опиоидрецепторни антагонисти (Lapo, et al., 2003).

Данните относно ефекта на неселективния опиоид-рецепторен антагонист налоксон (Nal) върху SIA са противоречиви. Така например налоксонът при tail-flick и hot-plate редуцира инхибицията на отговорите при имобилизационен стрес, което показва участието на опиоидните рецептори (Amir & Amit, 1978). Докато други автори показват, че Nal не променя латентния период т.е. опиоидните рецептори не участват в ноцицептивния отговор (Kiyatkin, 1989).

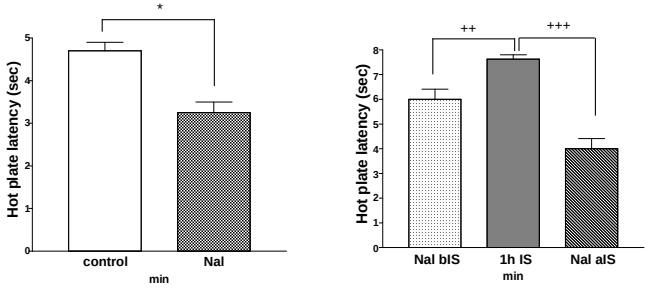
С цел изучаване участието на опиоидергичната система при SIA, налоксонът беше въвеждан в доза (1 mg/kg, i.p.) преди стреса или веднага след него, като изследванията започваха в първия случай веднага след стреса, а във втория - 20 минути след въвеждането на налоксона.

Налоксонът въведен (1 mg/kg, i.p.) веднага след IS понижи статистически достоверно болковия праг ($p<0.01$) и намали HP-латентния период ($p<0.001$) измерени 20 мин след инжектирането на Nal.

Въведен преди IS се наблюдаваше достоверно намаление на HP-латентността при HP теста ($p<0.01$) (Фиг. 9A и 9B).



A.



B.

Фиг.9*. Ефекти на налоксон (Nal), имобилизационен (IS) стрес при (A) PP и (B) HP тест; Въвеждане на Nal (1 mg/kg, i.p.) преди (Nal bIS) и след (Nal aIS) имобилизационен стрес. Данните са представени като средни стойности* ï *S.E.M.; *P<0.05 спрямо контрола;* $^{+}P<0.05$, $^{++}P<0.01$, $^{+++}P<0.001$ *спрямо 1h IS.*

Получените от нас резултати са в падкрепа на летературните данни, а именно, че най-често се среща т. нар. смесена SIA, която съдържа опиоидна и неопиоидна компонента, но в различно съотношение (Pacák K & Palkovits, 1998; Lapo, et al., 2003; Bocheva & Dzambazova, 2008). Известно е, че при студов стрес е застъпена предимно неопиоидната компонента, при топлинен стрес – опиоидната, докато при

имобилизационния стрес двете системи са приблизително еднакво застъпени (Pacák K, Palkovits, 1998; Lapo, et al., 2003; Bocheva & Dzambazova, 2008).

Беше изучено участието на опиоидергичната система в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 върху стрес-индуцираната аналгезия. Налоксонът беше въвеждан в доза 1 mg/kg, i.p. веднага след стреса и 20 мин преди инжектирането на пептидите. Изследванията започваха 15 минути след въвеждането им.

Получените резултати показаха, че налоксонът (Nal) въведен след едночасов имобилизационен стрес (IS) 20 мин преди Tyr-Cit-MIF-1 или Tyr-Cav-MIF-1 понижава статистически достоверно болковия праг в сравнение с този на IS и на пептидите при PP-теста. Понижението на болковия праг се наблюдава за целия период на изследването (Фиг. 5 и 6).

При HP-теста понижението на HP-латентния период е статистически достоверно за Nal+Tyr-Cit-MIF-1($p<0.01$) и Nal+Tyr-Cav-MIF-1($p<0.01$) в сравнение с този на IS и пептидите (Фиг. 7 и 8).

2. Изучаване участието на вторичните посредници в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 при имобилизационнастрес-индуцирана аналгезия

При съвместното въвеждане на MB+Tyr-Cit-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно понижение на болковия праг на 15 мин. ($p<0.05$) и 30 мин. ($p<0.05$) от изследването в сравнение с този на животните подложени на IS и Tyr-Cit-MIF-1 (Фиг. 5).

HP-латентният период също бе статистически достоверно намален само на 15 мин. от изследването в сравнение с този на животните подложени на IS ($p<0.05$) (Фиг. 6).

При въвеждане на MB+Tyr-Cav-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно понижение на болковия праг на 15 мин. ($p<0.01$), 30 ($p<0.01$) и 45 мин. ($p<0.01$) от изследването в сравнение с този за животните подложени на IS (Фиг.7).

Подобен резултат бе наблюдаван и при HP-теста – статистически достоверно намален HP-латентен период на 15 ($p<0.01$), 30 ($p<0.05$) и 45 мин. ($p<0.01$) от изследването в сравнение с контролните стойности за IS (Фиг. 8).

Заключение:

- *Новосинтезираните Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 и притежават аналгетични ефекти;*
- *Аналгетичният ефект на Tyr-Cav-MIF-1 е по-силно изразен в сравнение с този на Tyr-Cit-MIF-1;*
- *Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 понижават имобилизационната стрес-индуцирана аналгезия;*
- *Опиоидергичната система е въвлечена в механизма на аналгетичните им ефекти при* IS;
- *Вторичните посредници също са въвлечена в механизма на аналгетичните им ефекти при* IS;
- *Потискащият ефект на Tyr-Cav-MIF-1 е по-силно изразен в сравнение с този на Tyr-Cit-MIF-1 при имобилизационната стрес-индуцирана аналгезия*.

3. Изучаване участието на азотноокисната система в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 при имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия

В централната нервна система азотния оксид (NO) функционира като важна трансмитерна субстанция, която изпълнява и някои невромодулаторни функции. Азотният оксид е въвлечен в процесите на болката и е тясно свързан със стрес-индуцираната аналгезия (Vincent & Kimura, 1992; Yamada et al., 1995; Esch et al., 2002).

Инхибиторите на NO предизвикват антиноцицептивен ефект, който се реверсира от L-arginine и от донорите на NO (Erchegui et al., 1992, 1993).

Така например L-NAME (инхибитор на NO-синтетазата) въведен i.c.v. или i.p. повишава болковия праг при мишки и плъхове (Erchegui et al., 1992; Esch et al., 2002).

L-arginine u SIN-1 имат антагонистичен ефект върху ноцицепцията, която се антагонизира от налоксон, което подсказва, че и двата отговора са медирани от опиоидните рецептори (Chung et al., 2003).

Известно е, че NO функционира като сигнална молекула в нервната система, което радикално променя концепцията за невроналната комуникация. През 1997 г. от английски учени е прието, че терминът „нитрергични" се отнася за нервите, чиято трансмитерна функция зависи от освобождаването на NO или за трансмитерни

механизми, които са предизвикани от NO, което подчертава специфичните характеристики на този медиатор (Moncada et al., 1992).

Азотният оксид се синтезира в невроните на ЦНС и действа като невромедиатор и участва в процесите на паметта, контрола на невроналната активност и кръвния ток, модулирането на болката (Garthwaite, 1991; Snyder & Bredt, 1992).

Има задълбочени изследвания относно връзка на азотният оксид да освобождава глутамат. Известно е, че глутаматът активира NMDA рецепторите на постсинаптичните мембрани, които са отговорни за активирането на калциевите канали. След навлизането на Ca^{2+} в постсинаптичния неврон се активира NOS. Новосинтезираният NO се връща обратно до синаптичният край и като ретроградeн посредник активира разтворимата гуанилатциклаза. Повишаването на цГМФ активира освобождаването на глутамат в синапсите (положителна обратна връзка).

Повечето ноцицептивни рефлекси включват взаимодействието на NO и NMDA рецепторите. Установено, че синтеза на NO усилва аферентния сигнал предаван от гръбначния мозък към кортекса и впоследствие изразен в поведенчески отговор (Mayer & Price, 1976).

В периферната нервна система той се секретира от неадренергични и нехолинергични неврони и предизвиква вазодилатация, регулация на гастроинтестиналната, респираторната функции (Gillespie et al., 1990; Rand, 1992).

Азотният оксид е тясно свързан със SIA (Vincent & Kimura, 1992; Yamada et al., 1995; Esch et al., 2002).

Стресът предизвиква биохимични промени засягащи болковия праг и поведението. Изследвани са ноцицептивните промени при остър и хроничен имбилизационен стрес след въвеждане на донора на NO (нитроглицерин) у плъхове и е установено е, че нитроглицеринът предизвиква хипералгезия (Costa et al., 1993). Острият стрес (90 min) има изразен аналгетичен ефект, който не се реверсира напълно от нитроглицерин.

Както стресът, така и NO имат увреждащо действие, което зависи от продължителността на отделянето му, количеството на продукцията и типа на синтезираните NO молекули.

Освен това NO противодейства на NA активността и симпатиковия отговор, инхибира освобождаването на моноаминните трансмитерни молекули и тук участват също авторегулаторни пътища въвличащи различни сигнални молекули като опиати

и ендоканабиноиди (Esch et al., 2002). Редица експерименти показват, че NO системата е стрес-лимитираща (Gilinskii et al., 2005).

В нашите експерименти прилагахме L-NAME (10 mg/kg, i.p) и L-Arg (1 mg/kg, i.p) инжектирани след съответния стрес и 20 мин. преди пептидите. Измерването на болковия праг с PP и HP тестовете започваше 15 мин. след интраперитонеалното въвеждане на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 (и двата пептида в доза 1 mg/kg).

При съвместното въвеждане на L-NAME+Tyr-Cit-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на болковия праг на 15 ($p<0.01$) и 30 мин. ($p<0.01$) от изследването и статистически достоверно понижаване на HP-латентния период на 15 мин. ($p<0.01$) в сравнение с животните подложени на IS (Фиг.10 и 11).

При PP-теста въвеждането на L-NAME+Tyr-Cav-MIF-1 на 15 мин. ($p<0.01$) статистически достоверно увеличи стрес-индуцираната аналгезия и я намали на 30 мин. ($p<0.01$) от изследването, докато при HP-теста се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на HP-латентния период на 15 мин. ($p<0.05$) в сравнение с контролните стойности за IS (Фиг. 12 и 13).

Различните резултати при двата вида тест биха могли да бъдат обяснени с различното участие на двата вида механо- и терморецепторите.

Известно е, че както L-NAME, така и Tyr-Cav-MIF-1 имат антиноцицептивен ефект и потенцирането на 15 мин от изследването може да бъде обяснено със сумиране на техните ефекти.

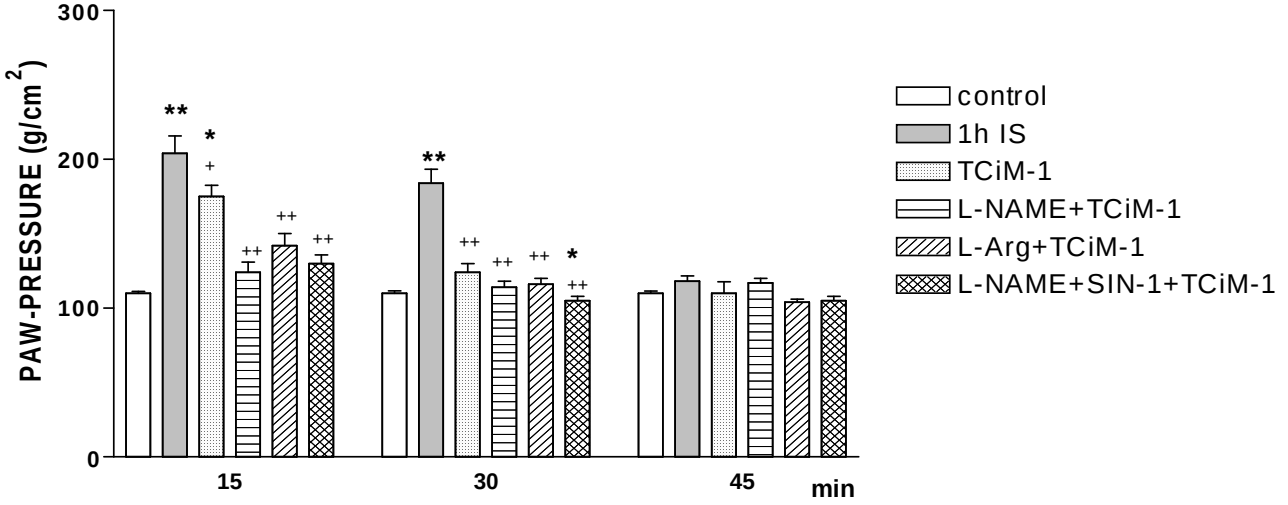
На 30 мин. обаче Tyr-Cav-MIF-1 статистически достоверно намали болковия праг, който бе равен на този контролата.

При съвместното въвеждане на L-NAME+Tyr-Cav-MIF-1 и L-NAME+Tyr-Cit-MIF-1 по-силно изразен ефект на потискане се наблюдаваше на 30 мин. за Tyr-Cav-MIF-1.

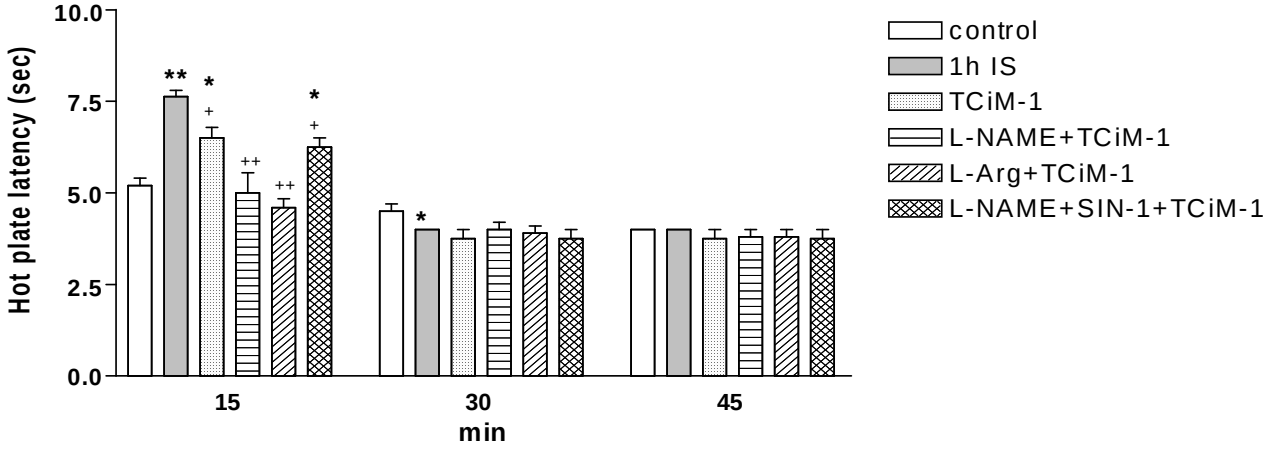
Литературните данни показват, че L-arginine (L-arg) въведен интрацереброventрикулно (i.c.v.) или подкожно (s.c.) предизвиква налоксон-обратим аналгетичен ефект при мишки и плъхове (Erchegui et al., 1992, 1993; Esch et al., 2002). При пациенти с различни видове хронична болка е наблюдавано налоксон-обратимост на аналгетичния ефект на въведения L-arg (Esch et al., 2002).

В нашите опити L-arginine беше въвеждан в доза (1 mg/kg, i.p.). При съвместното въвеждане на L-arg+Tyr-Cit-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на болковия праг ($p<0.01$) през целия период на изследването

и намаляване на HP-латентния период (p<0.01) на 15 мин. в сравнение с този на животните подложени на IS (Фиг. 10 и 11).



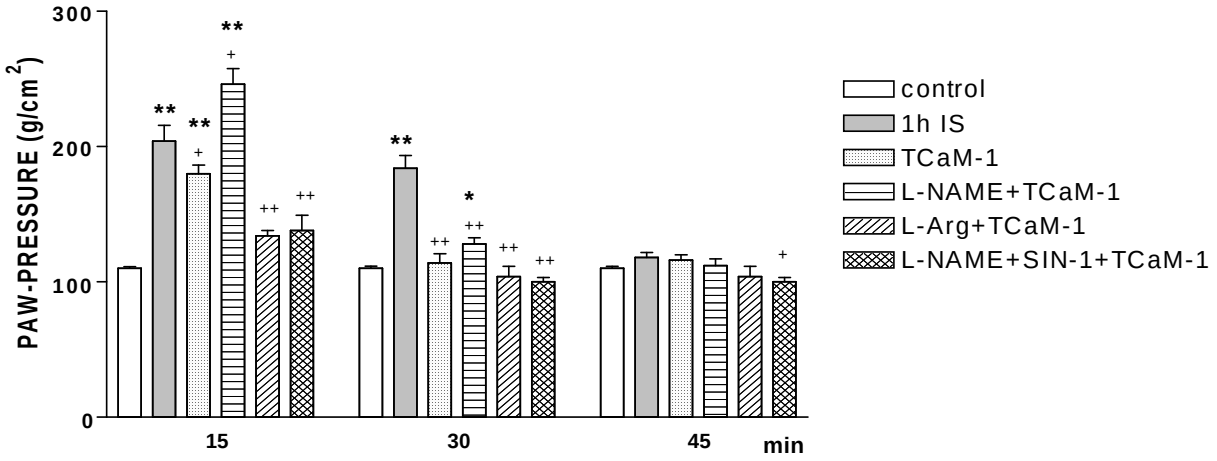
Фиг. 10. *Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 (1 mg/kg, i.p.) и съвместното му въвеждане с L-NAME (10 mg/kg, i.p.), L-Arg (1 mg/kg, i.p.) и L-NAME+SIN-1 (SIN-1 - 0,2 mg/kg, i.p.) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия (1h IS) в PP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05; **P<0.01 спрямо контрола; $^{+}$P<0.05, $^{++}$P<0.01 спрямо 1h IS.*



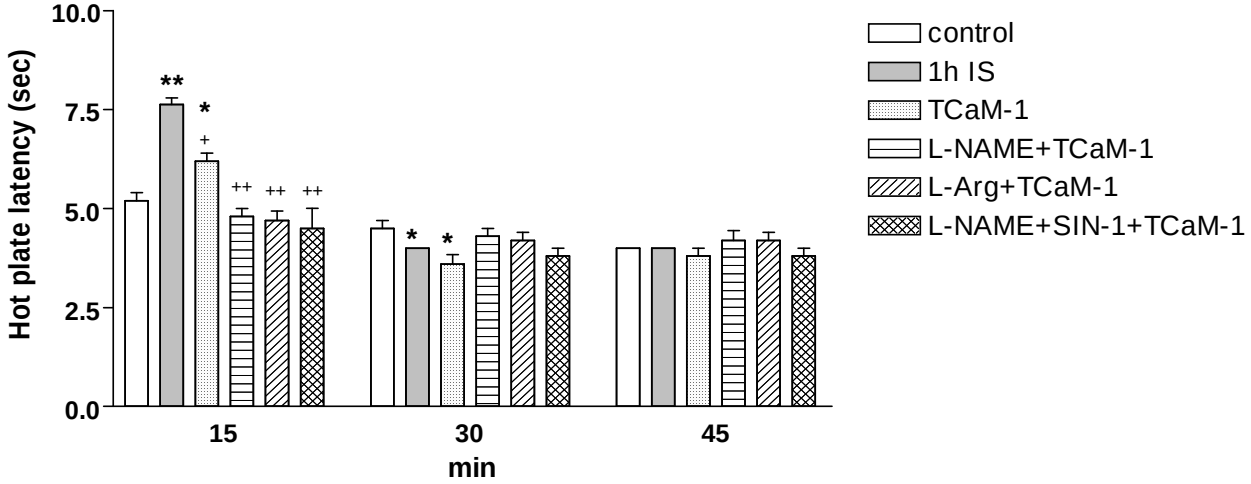
Фиг.11. *Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 (TCiM-1, 1 mg/kg, i.p.) и съвместното му въвеждане с L-NAME (10 mg/kg, i.p.), L-Arg (1 mg/kg, i.p.) и L-NAME+SIN-1 (SIN-1 - 0,2 mg/kg, i.p.) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия (1h IS) в HP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05; **P<0.01 спрямо контрола; $^{+}$P<0.05, $^{++}$P<0.01 спрямо 1h IS.*

При съвместното въвеждане на L-NAME+SIN-1+Tyr-Cit-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на болковия праг (p<0.01) на 15 и 30 мин. и намаляване на HP-латентния период (p<0.01) на 15 мин. в сравнение с този на животните подложени на IS (Фиг. 10 и 11).

При съвместното въвеждане на L-arg+Tyr-Cav-MIF-1 се наблюдаваха аналогични резултати - статистически достоверно намаляване на болковия праг ($p<0.01$) на 15 и 30 мин. от изследването в сравнение с този на животните подложени на IS, а при HP-теста намаляване на HP-латентния период на 15 мин. в сравнение с контролните стойности за IS ($p<0.01$) (Фиг. 12 и 13).



Фиг. 12. *Ефекти на Tyr-Cav-MIF-1 (TCaM-1, 1 mg/kg, i.p.) и съвместното му въвеждане с L-NAME (10 mg/kg, i.p.), L-Arg (1 mg/kg, i.p.) и L-NAME+SIN-1 (SIN-1 - 0,2 mg/kg, i.p.) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия (1h IS) в PP тест. Данните са представени като средни стойности* ï *S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола;* $^{+}P<0.05$; $^{++}P<0.01$ *спрямо 1h IS.*



Фиг. 13. *Ефекти на Tyr-Cav-MIF-1 (TCaM-1, 1 mg/kg, i.p.) и съвместното му въвеждане с L-NAME (10 mg/kg, i.p.), L-Arg (1 mg/kg, i.p.) и L-NAME+SIN-1 (SIN-1 - 0,2 mg/kg, i.p.) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия (1h IS) в HP тест. Данните са представени като средни стойности* ï *S.E.M.; *P<0.05; **P<0.01 спрямо контрола;* $^{++}P<0.01$ *спрямо 1h IS.*

Съвместното въвеждане на L-Arg+Tyr-Cav-MIF-1 предизвиква по-силно потискане на IS в сравнение с ефекта на L-Arg+Tyr-Cit-MIF-1.

Донорът на азотния оксид, SIN-1 въведен на интактни животни предизвиква статистически достоверна хипералгезия в продължение на два часа (Erchegyi et al., 1993). Methylene blue антагонизира хипералгезията предизвиканата от SIN-1, което е доказателство за въвличане на L-Arg-NO пътя. Известно е, че той модулира двата централни и периферни антиноцицептивни ефекти на вещества свързани с μ-рецепторите (Erchegyi et al., 1992).

При съвместното въвеждане на L-NAME+SIN-1+Tyr-Cav-MIF-1 се наблюдаваха аналогични резултати - статистически достоверно намаляване на болковия праг ($p<0.01$) на 15 и 30 мин. от изследването в сравнение с този на животните подложени на IS, а при HP-теста и намаляване на HP-латентния период на 15 мин. в сравнение с контролните стойности за IS ($p<0.01$) (Фиг. 12 и 13).

При съвместното въвеждане на L-Arg+SIN-1+Tyr-Cav-MIF-1 се наблюдава по-силно изразен противоболков ефект в сравнение с L-Arg+SIN-1+Tyr-Cit-MIF-1.

Заключение:

- *Азотноокисната система е въвлечена в аналгетичните ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 при едночасова имобилизационна-стрес индуцирана аналгезия;*
- *Tyr-Cav-MIF-1 потисна по-силно аналгетичните ефекти предизвикани от въвеждането на L-NAME, L-Arg или SIN-1 при едночасова имобилизационна стрес- индуцирана аналгезия.*

III. ИЗУЧАВАНЕ АНАЛГЕТИЧНИ ЕФЕКТИ И МЕХАНИЗМИ НА ДЕЙСТВИЕ НА TYR-CIT-MIF-1 И TYR-CAV-MIF-1 ПРИ СТУДОВА СТРЕС-ИНДУЦИРАНА АНАЛГЕЗИЯ

Литературните данни показват, че студовият стрес повишава противоболковите ефекти при някои термични тестове (Galina & Kastin 1987; Kavaliers, 1988). Противоречиви са данните относно ефекта на налоксон върху студовата стрес-индуцирана аналгезия. Според едни автори той няма ефект (Kavaliers, 1988), а според други - налоксонът въведен преди студовия стрес блокира дозо-зависимо аналгезията

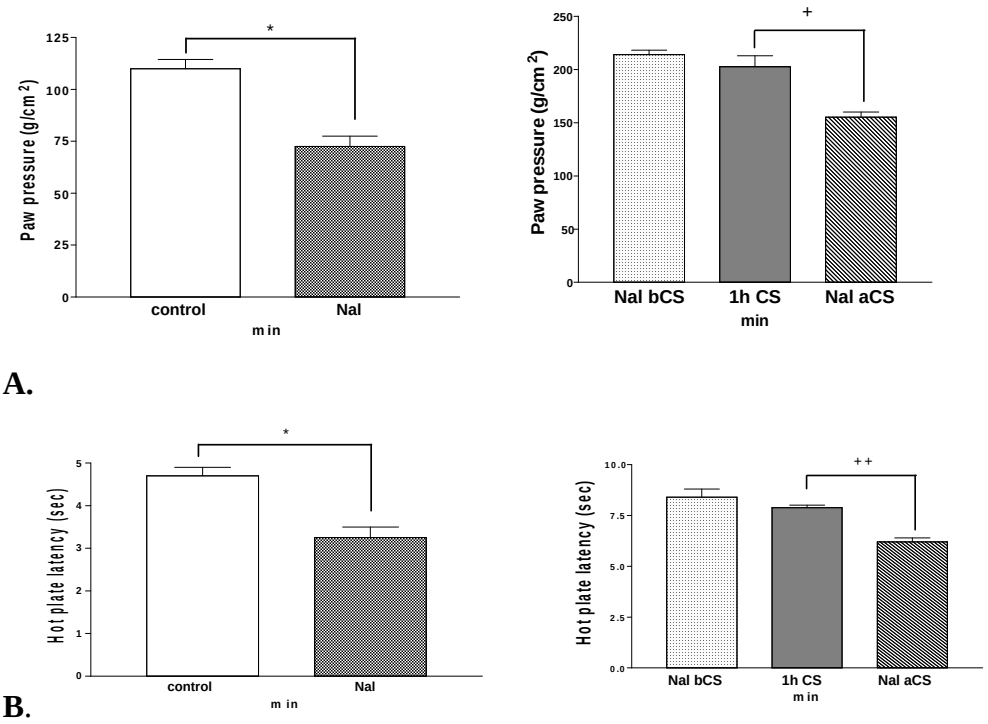
(Vaswani K. et al., 1988). При студов стрес се активира хипоталамичния норадреналин.

Относно двата новосинтезирани пептида Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 в научната литература няма данни за ефектите им върху студовата стрес-индуцирана аналгезия (Cesselin, 1995).

1. Изучаване участието на опиоидергичната система в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 върху студовата стрес-индуцирана аналгезия

Контролната група животни бяха инжектирани с физиологичен разтвор в обем 1 ml/kg, i.p. Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 бяха инжектирани i.p. в доза 1mg/kg след едночасов студов стрес. Изследванията започваха 15 минути след въвеждането на пептидите.

Получените резултати показаха, че едночасовия студов стрес (1h CS), достоверно повишава болковия праг при PP теста в сравнение с контролата на 15 ($p<0.01$), 30 ($p<0.01$) и 45 мин ($p<0.05$) от изследването (Фиг. 15).



Фиг. 14 *. Ефекти на налоксон (Nal), студов(CS) стрес при (A) PP и (B) HP тест; Въвеждане на Nal (1 mg/kg, i.p.) преди (Nal bCS) и след (Nal aCS) студовия стрес. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05 спрямо контрола;* $^{+}$*P<0.05,* $^{++}$*P<0.01,* $^{+++}$*P<0.001 спрямо1h CS.*

HP-латентността бе понижена статистически достоверно ($p<0.01$) на 15 и 30 мин. спрямо тази на животните подложени на едночасов студов стрес (Фиг. 16). Инжектирането на Nal преди 1h CS не промени болковия праг, докато въведен веднага след него понижи статистически достоверно болковия праг ($p<0.05$) и намали HP латентния период ($p<0.01$) (Фиг. 14A и 14B).

Получените резултати показаха, че Tyr-Cit-MIF-1 понижава статистически достоверно ($p<0.05$) студовата стрес-индуцирана аналгезия при PP-теста през целия период на изследването (Фиг. 15).

Tyr-Cav-MIF-1 статистически достоверно понижи болковия праг и HP-латентността при студовата стрес-индуцирана аналгезия на 15 ($p<0.05$), 30 ($p<0.01$), и 45 мин ($p<0.05$) от изследването (Фиг. 17).

При HP-теста Tyr-Cav-MIF-1 понижи HP-латентността, като стойностите бяха по-ниски от контролите и тези на студовата стрес-индуцирана аналгезия за целия изследван период ($p<0.01$)(Фиг. 18).

При съвместното въвеждане Nal+Tyr-Cit-MIF-1 ($p<0.01$) и Nal+Tyr-Cav-MIF-1 ($p<0.01$) при двата използвани теста се набюдаваше статистически достоверно понижаване на болковия праг и HP-латентността (Фиг. 15-18).

Според някои автори налоксонът няма ефект върху студовата стрес-индуцирана аналгезия (Kavaliers, 1988), а според други, Nal въведен преди студовия стрес блокира дозо-зависимо аналгезията (Vaswani et al., 1988).

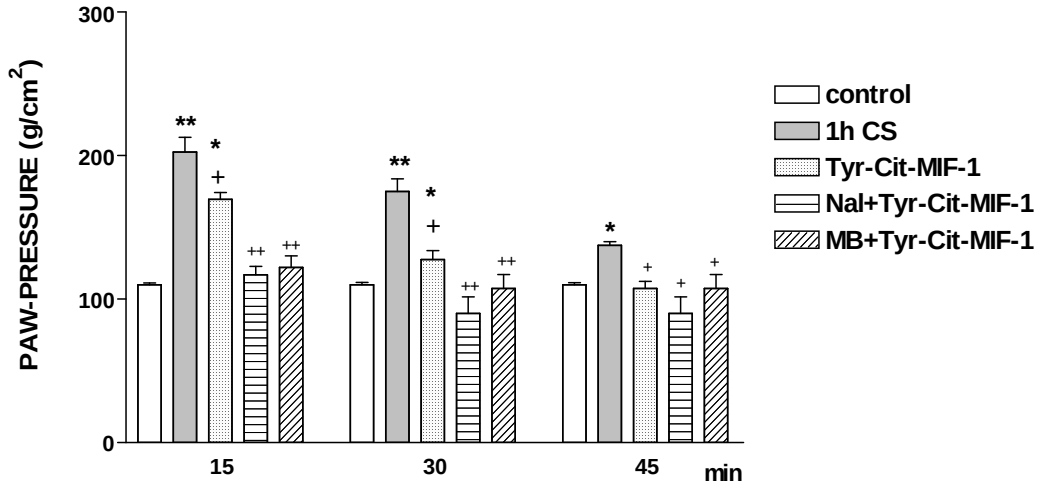
С цел изясняване участието на опиоидергичната система при SIA, налоксонът беше въвеждан в доза 1 mg/kg, i.p. преди стреса или веднага след него. Изследванията започваха в първия случай веднага след стрес процедурата, а във втория - 20 минути след въвеждането на Nal.

Получените резултати при студов стрес са в унисон с литературните данни, според които при CS се увеличава антиноцицепцията при tail-flick и hot-plate тестове (Galina & Kastin 1987; Kavaliers, 1988).

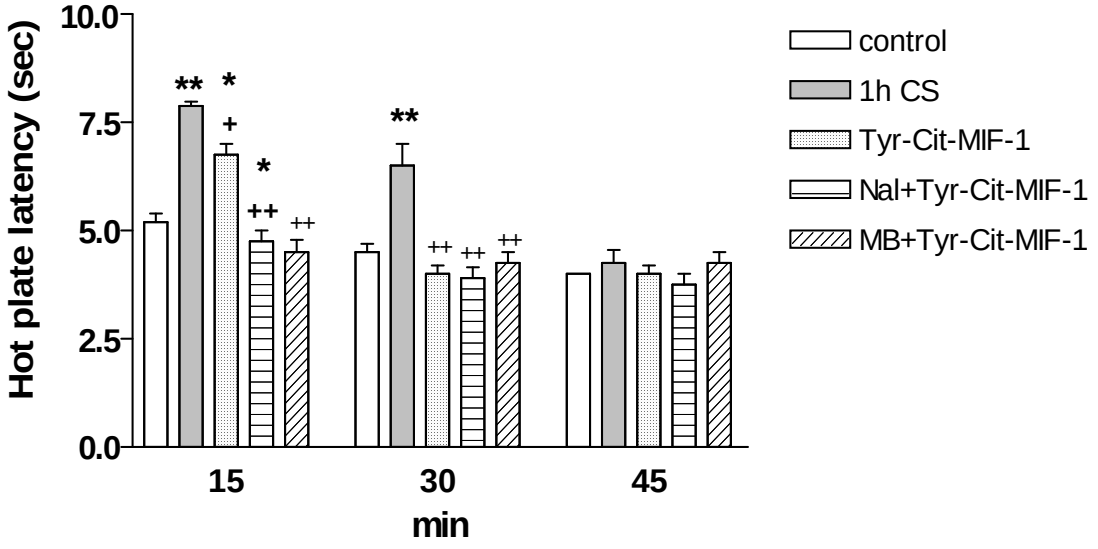
2. Изучаване участието на вторичните посредници в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 върху студова стрес-индуцирана аналгезия

Methylene blue (MB) широко се използва за инхибиране на cGMP-медиираните процеси (Esch et al., 2002). При съвместното въвеждане на MB+Tyr-Cit-MIF-1 и

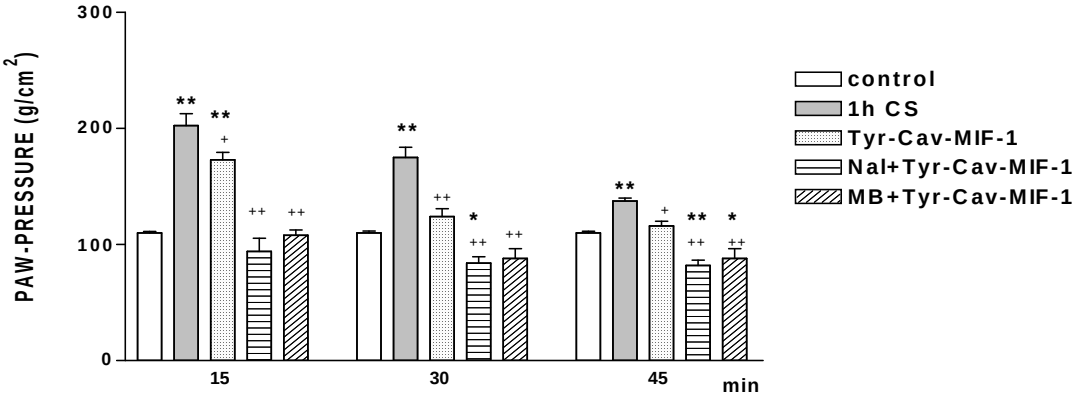
MB+Tyr-Cav-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на болковия праг и на HP-латентността за целия период на изследване (Фиг. 15-18).



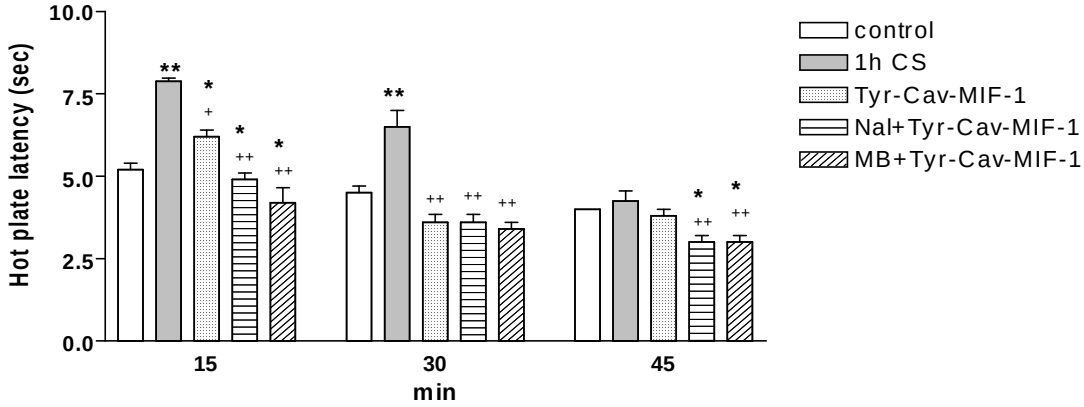
Фиг. 15. *Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 и съвместното му въвеждане с налоксон (Nal)(всички в доза 1 mg/kg, i.p.) и метилен блу (MB)(500µg/rat) върху студова стрес-индуцирана аналгезия (1h CS) в PP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола; $^{+}$P<0.05, $^{++}$P<0.01 спрямо 1h CS.*



Фиг. 16. *Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 и съвместното му въвеждане с налоксон (Nal)(всички в доза 1 mg/kg, i.p.) и метилен блу (MB)(500µg/rat) върху студова стрес-индуцирана аналгезия (1h CS) в HP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола; $^{+}$P<0.05, $^{++}$P<0.01 спрямо 1h CS.*



Фиг 17. *Ефекти на Tyr-K-MIF-1 и съвместното му въвеждане с налоксон (Nal)(всички в доза 1 mg/kg, i.p.) и метилен блу (MB)(500µg/rat) върху студова стрес-индуцирана аналгезия (1h CS) в PP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола; $^{+}$P<0.05, $^{++}$P<0.01 спрямо 1h CS.*



Фиг. 18. *Ефекти на Tyr-Cav-MIF-1 и съвместното му въвеждане с налоксон (Nal)(всички в доза 1 mg/kg, i.p.) и метилен блу (MB)(500µg/rat) върху студова стрес-индуцирана аналгезия (1h CS) в HP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола; $^{+}$P<0.05, $^{++}$P<0.01 спрямо 1h CS.*

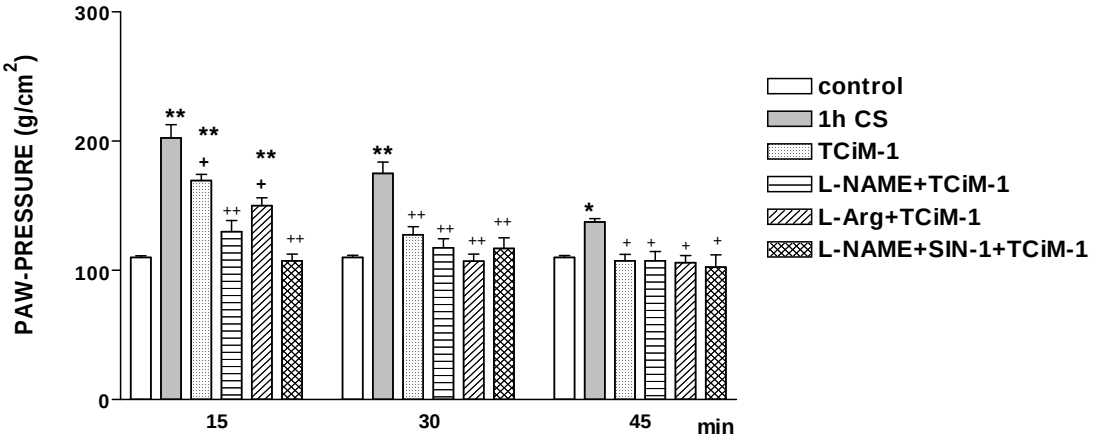
Заключение:

- *Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 имат ефекти при студовата стрес-индуцирана аналгезия;*
- *Опиоидергичната система е въвлечена в механизма на тяхното действие.*
- *Tyr-Cav-MIF-1 има по-силно изразени противоболкови ефекти в сравнение с тези на Tyr-Cit-MIF-1;*
- *Получените резултати подсказват, че ефектите на MB+Tyr-Cit-MIF-1 и MB+Tyr-Cav-MIF-1 при едночасов студов стрес се медиират и от вторични посредници, като по-силно изразени са ефектите на Tyr-Cav-MIF-1 при двата използвани теста.*

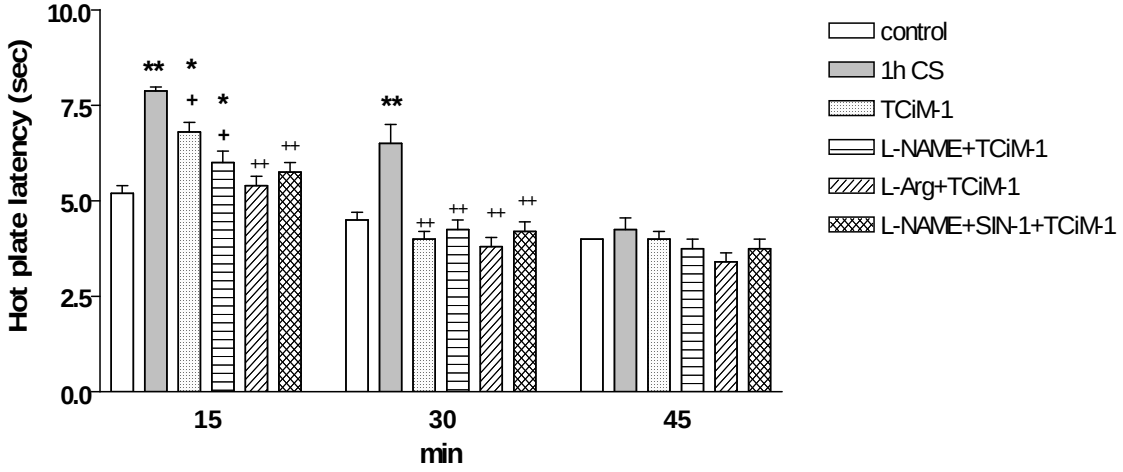
3. Изучаване участието на азотноокисната система в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 върху студова стрес-индуцирана аналгезия

Инхибиторът на азотния оксид L-NAME беше въвеждан в доза 10 mg/kg, i.p. При съвместното въвеждане на L-NAME+Tyr-Cit-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на студовата стрес-индуцираната аналгезия на 15 ($p<0.01$), 30 ($p<0.01$) и 45 мин. ($p<0.05$) от изследването при PP-теста (Фиг. 19).

При въвеждане на L-NAME+Tyr-Cit-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на HP-латентния период на студовата стрес-индуцирана аналгезия на 15 ($p<0.01$) и 30 мин. ($p<0.01$) (Фиг. 20).



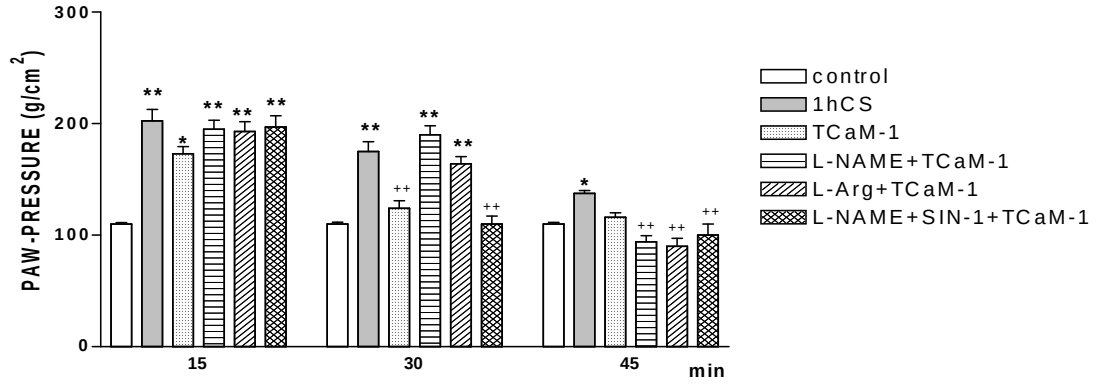
Фиг.19. *Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 (TCiM-1, 1 mg/kg, i.p.) и съвместното му въвеждане с L-NAME (10 mg/kg, i.p.), L-Arg (1 mg/kg, i.p.) и L-NAME+SIN-1 (SIN-1 - 0,2 mg/kg, i.p.) върху студова стрес-индуцирана аналгезия (1h CS) в PP тест. Данните са представени като средни стойности* ï *S.E.M.; *P<0.05; **P<0.01 спрямо контрола; +P<0.05, ++P<0.01 спрямо 1h CS.*



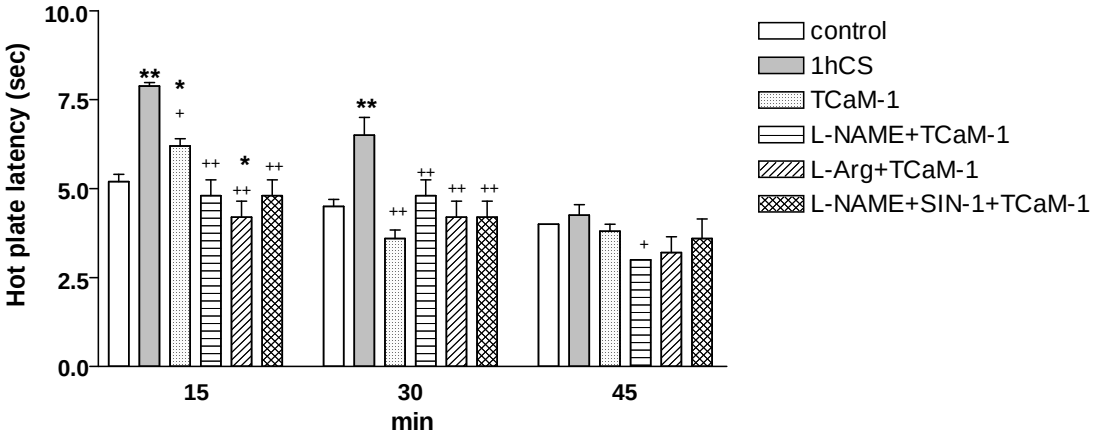
Фиг. 20. *Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 (TCiM-1, 1 mg/kg, i.p.) и съвместното му въвеждане с L-NAME (10 mg/kg, i.p.), L-Arg (1 mg/kg, i.p.) и L-NAME+SIN-1 (SIN-1 - 0,2 mg/kg, i.p.) върху студова стрес-индуцирана аналгезия (1h CS) в HP тест. Данните са представени като средни стойности* ï *S.E.M.; *P<0.05; **P<0.01 спрямо контрола; +P<0.05, ++P<0.01 спрямо 1h CS.*

При съвместното въвеждане на L-NAME+Tyr-Cav-MIF-1статистически достоверно намаляване на болковия праг се наблюдаваше само на 45 мин ($p<0.01$) от изследването в сравнение с този на CS. Докато на 15 и 30 мин. L-NAME потенцираше ефекта на пептида, но нямаше ефект спрямо животните подложени на студов стрес (Фиг.21).

При HP теста се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на HP-латентния период в сравнение с контролните стойности за CS през целия изследван период - на 15 ($p<0.01$), 30 ($p<0.01$) и 45 мин. ($p<0.05$) (Фиг. 22).



Фиг. 21. *Ефекти на Tyr-Cav-MIF-1 (TCaM-1, 1 mg/kg, i.p.) и съвместното му въвеждане с L-NAME (10 mg/kg, i.p.), L-Arg (1 mg/kg, i.p.) и L-NAME+SIN-1 (SIN-1 - 0,2 mg/kg, i.p.) върху студова стрес-индуцирана аналгезия (1h CS) в PP тест. Данните са представени като средни стойности* ï *S.E.M.; *P<0.05; **P<0.01 спрямо контрола; +P<0.05, ++P<0.01 спрямо 1h CS.*



Фиг. 22. *Ефекти на Tyr-Cav-MIF-1 (TCaM-1, 1 mg/kg, i.p.) и съвместното му въвеждане с L-NAME (10mg/kg, i.p.), L-Arg (1 mg/kg, i.p.) и L-NAME+SIN-1 (SIN-1 - 0,2 mg/kg, i.p.) върху студова стрес-индуцирана аналгезия (1h CS) в HP тест. Данните са представени като средни стойности* ï *S.E.M.;*P<0.05; **P<0.01 спрямо контрола; +P<0.05, ++P<0.01 спрямо 1h CS.*

В нашите опити L-arginine беше въвеждан в доза 1mg/kg, i.p. При съвместното въвеждане на L-arg+Tyr-Cit-MIF-1 статистически достоверно намаляване на болковия праг се наблюдаваше за целия период на изследването ($p<0.01$) (Фиг.19).

При НР теста се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на НР-латентцията на 15 ($p<0.01$) и 30 мин. ($p<0.05$) от изследвания период в сравнение с контролните стойности за CS (Фиг.20).

При съвместното въвеждане на L-arg+Tyr-Cav-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на болковия праг на 15 ($p<0.01$), 30 ($p<0.01$) и 45 мин. ($p<0.01$) и намаляване на НР-латентния период на 15 ($p<0.01$) и 30 мин. ($p<0.01$) в сравнение с този на животните подложени на CS (Фиг. 21 и Фиг. 22).

SIN-1 беше въвеждан в доза (0, 2 mg/kg, i.p.). При съвместното въвеждане на L-NAME+SIN-1+Tyr-Cit-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на болковия праг на 15 ($p<0.01$), 30 ($p<0.01$) и 45 мин. ($p<0.05$) и намаляване на НР-латентния период на 15 ($p<0.01$) и 30 мин. ($p<0.01$) в сравнение с този на животните подложени на CS (Фиг. 19 и Фиг. 20).

При въвеждането на комбинацията L-NAME+SIN-1+Tyr-Cav-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на болковия праг на 30 и 45 мин. ($p<0.01$) от изследването в сравнение с този на животните подложени на CS, а при НР теста - намаляване на НР-латентния период на 15 и 30 мин. в сравнение с контролните стойности за CS ($p<0.01$) (Фиг. 21 и Фиг. 22).

Заключение:

Получените резултати показват, че:

- *Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 потискат студовата стрес-индуцирана аналгезия;*
- *Нитрикоксайдергичната система е въвлечена в механизма им на действие;*
- *При студовия стрес участват механо- и терморецепторите;*
- *По-силно изразени бяха ефектите на Tyr-Cav-MIF-1 при студовата стрес-индуцирана аналгезия.*

IV. ИЗУЧАВАНЕ АНАЛГЕТИЧНИ ЕФЕКТИ И МЕХАНИЗМИ НА ДЕЙСТВИЕ НА TYR-CIT-MIF-1, TYR-CAV-MIF-1 ПРИ ТОПЛИННА СТРЕС – ИНДУЦИРАНА АНАЛГЕЗИЯ

1. Изучаване участието на опиоидергичната система в ефектете на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 върху топлинна стрес-индуцирана аналгезия

Както при при студовия стрес, така и топлинния стрес се увеличава антиноцицепцията при tail-flick и hot-plate тестове (Galina & Kastin, 1987; Kavaliers, 1988). Аналгетичните ефекти при топлинната стрес-индуцираната аналгезия са налоксон-зависими (Kavaliers, 1988).

Контролната група животни бяха инжектирани с физиологичен разтвор в обем 1ml/kg,i.p. При едночасов топлинен стрес се наблюдаваше добре изразен и статистически достоверен, аналгетичен ефект на 15 мин. ($p<0.01$) от изследването, който намалява с времето и е по-слабо изразен на 30 ($p<0.05$) и 45 мин. ($p<0.01$) (Фиг. 23). След едночасовия топлинен стрес не бяха наблюдавани промени в HP-латентния период в сравнение със стойностите на контролните животните (Фиг. 24).

Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 бяха инжектирани i.p. в доза 1 mg/kg след едночасов топлинен стрес. Изследванията започваха 15 минути след въвеждането на пептидите.

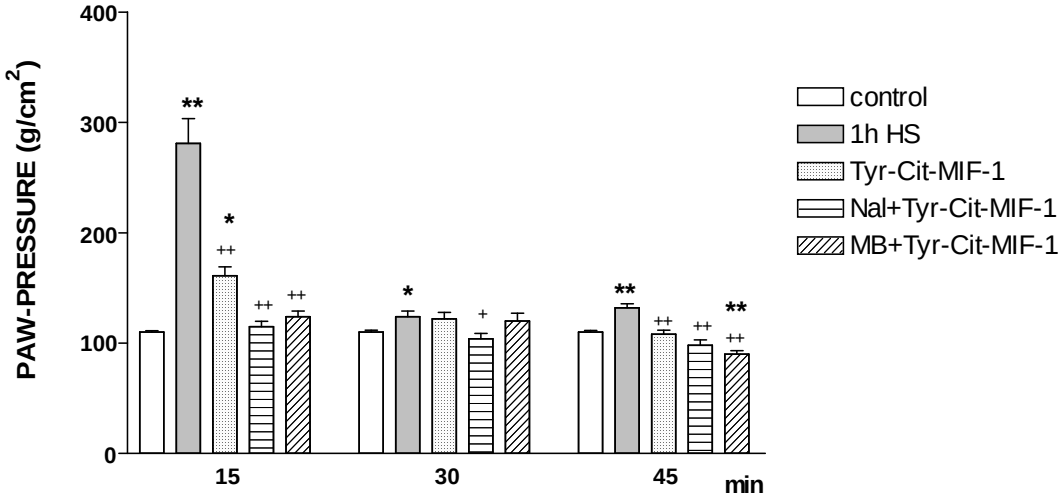
Получените резултати показаха, че Tyr-Cit-MIF-1 на 15 мин. подтиска топлинната стрес-индуцирана аналгезия статистически достоверно ($p<0.01$) при PP теста (Фиг. 23). HP-латентността на животните подложени на едночасов топлинен стрес бе повишена след въвеждането на Tyr-Cit-MIF-1 само на 15 мин. от изследването (Фиг. 24).

Въвеждането на Tyr-Cav-MIF-1 статистически достоверно понижи болковия праг при топлинната стрес-индуцирана аналгезия на 15, 30 и 45 мин ($p<0.01$) след въвеждането му (Фиг. 25). При HP-теста Tyr-Cav-MIF-1 понижи HP-латентността до стойности по-ниски от контролната и на HP-латентността при 1часов топлинен стрес за целия изследван период (Фиг. 26).

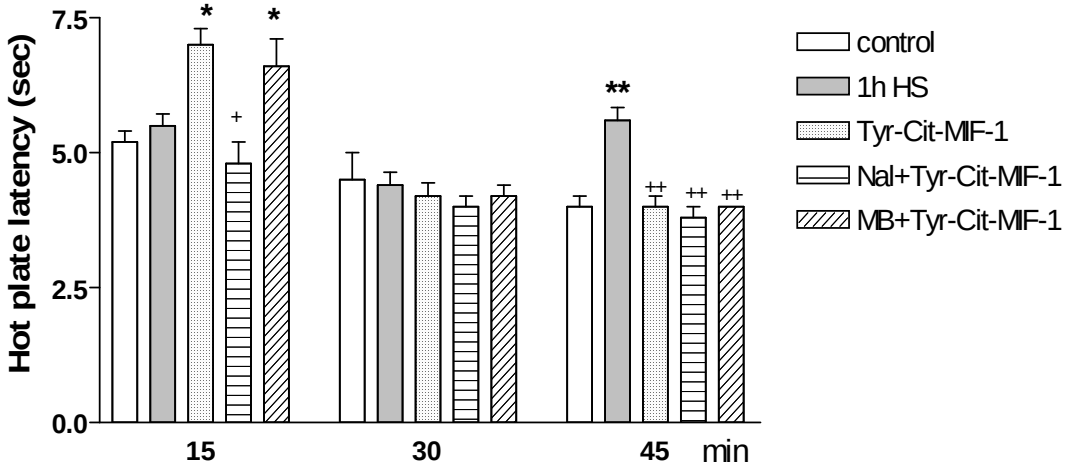
Прави впечатление, че при едвочасов топлинен стрес Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 статистически достоверно намаляват болковия праг и HP-латентността (Фиг. 23 - 26).

При въвеждането на налоксон 20 мин след 1ч HS, т.е. преди всеки от двата изследвани пептида при PP тест, се наблюдава статистически достоверно понижаване на болковия праг на 15 ($p<0.01$), 30 ($p<0.05$) и 45 мин. ($p<0.01$) в сравнение с животните подложени на едночасов HS (Фиг. 23 и Фиг. 25).

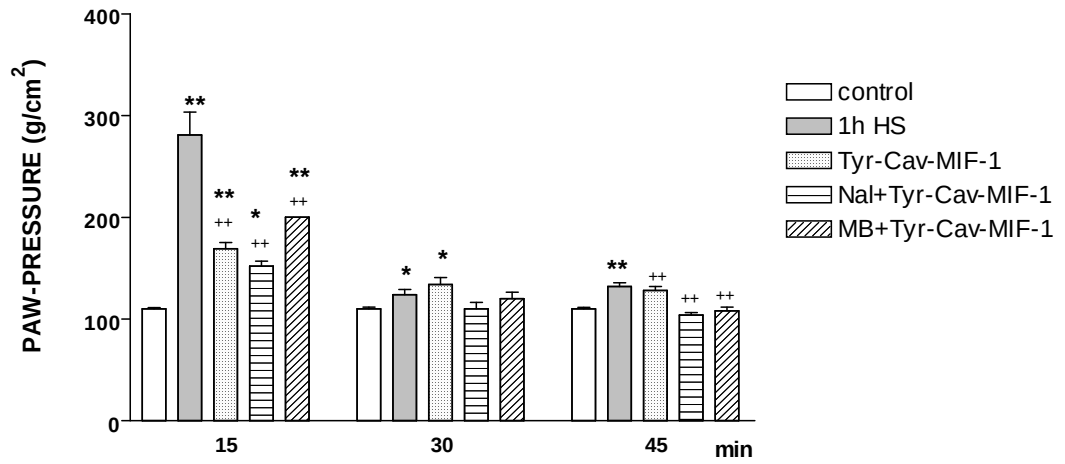
При HP теста Nal+Tyr-Cit-MIF-1 и Nal+Tyr-Cav-MIF-1 намаляват статистически достоверно HP-латентния период на 15, 30 и 45 мин. в сравнение с животните подложени на едночасов HS (Фиг. 24 и Фиг. 26).



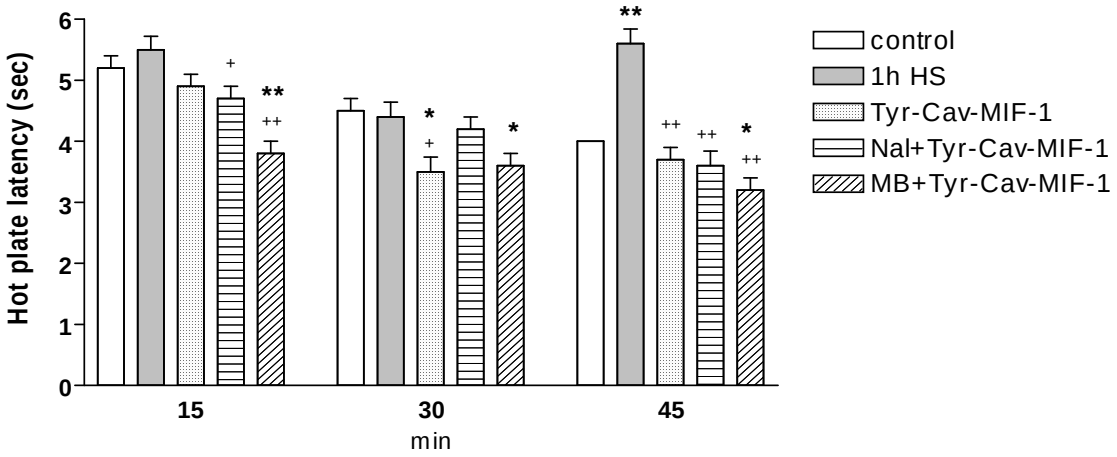
Фиг. 23. *Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 и съвместното му въвеждане с налоксон (Nal)(всички в доза 1 mg/kg, i.p.) и метилен блу (MB)(500μg/rat) върху топлинна стрес-индуцирана аналгезия (1h HS) в PP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола; $^{+}P<0.05$, $^{++}P<0.01$ спрямо 1h HS.*



Фиг. 24. *Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 и съвместното му въвеждане с налоксон (Nal)(всички в доза 1 mg/kg, i.p.) и метилен блу (MB)(500μg/rat) върху топлинна стрес-индуцирана аналгезия (1h HS) в HP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола; $^{+}P<0.05$, $^{++}P<0.01$ спрямо 1h HS.*



Фиг. 25. *Ефекти на Tyr-Cav--MIF-1 и съвместното му въвеждане с налоксон (Nal)(всички в доза 1 mg/kg, i.p.) и метилен блу (MB)(500µg/rat) върху топлинна стрес-индуцирана аналгезия (1h HS) в PP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола; $^{+}$P<0.05, $^{+}$P<0.05, $^{++}$P<0.01 спрямо 1h HS.*



Фиг. 26. *Ефекти на Tyr-K-MIF-1 и съвместното му въвеждане с налоксон (Nal)(всички в доза 1 mg/kg, i.p.) и метилен блу (MB)(500µg/rat) върху топлинна стрес-индуцирана аналгезия (1h HS) в HP тест. Данните са представени като средни стойности ï S.E.M.; *P<0.05, **P<0.01 спрямо контрола; $^{+}$P<0.05, $^{++}$P<0.01 спрямо 1h HS.*

Заключение:

Получените резултати показват, че:

- *Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 оказват влияние върху топлинната стрес-индуцирана аналгезия и*
- *Опиоидергичната система е въвлечена в механизма им на действие*
- *При топлинния стрес участват механо- и терморецепторите.*

2. Изучаване участието на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 и вторичните посредници върху топлинната стрес-индуцирана аналгезия.

При съвместното въвеждане на MB+Tyr-Cit-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на болковия праг на 15 ($p<0.01$) и 45 мин. ($p<0.01$), а на HP-латентността - само на 45 ($p<0.01$) от изследването в сравнение с животните подложени на HS (Фиг. 23 и Фиг. 24).

При въвеждането на MB+Tyr-Cav-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на топлинната стрес-индуцирана аналгезия на 15 ($p<0.01$) и 45 мин. ($p<0.01$), а на HP-латентността през целия изследван преиод ($p<0.01$) (Фиг. 25 и Фиг. 26).

Заключение:

Получените резултати показват, че:

- *Еефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 при едночасов топлинен стрес се медиират и от вторични посредници***;**
- *По-силно изразени са противоболковите ефекти на Tyr-Cav-MIF-1*.

3. Изучаване участието на азотноокисната система в ефектите на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 върху топлинна стрес-индуцирана аналгезия

3.1. Участие на L-NAME в аналгетичната активност на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 след едночасов топлинен стрес (HS)

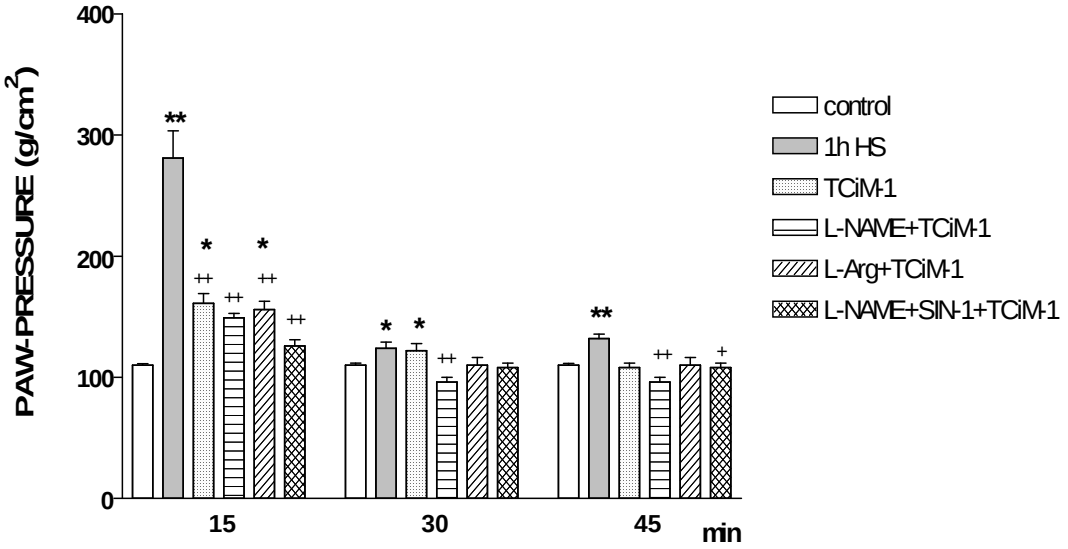
Както в предишните опитни серии, инхибиторът на азотния оксид - L-NAME беше въвеждан в доза 10 mg/kg, i.p.

При съвместното въвеждане на L-NAME+Tyr-Cit-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на топлинната стрес-индуцираната аналгезия на 15 ($p<0.01$), 30 ($p<0.01$) и 45 мин. ($p<0.01$) от изследването (Фиг. 27).

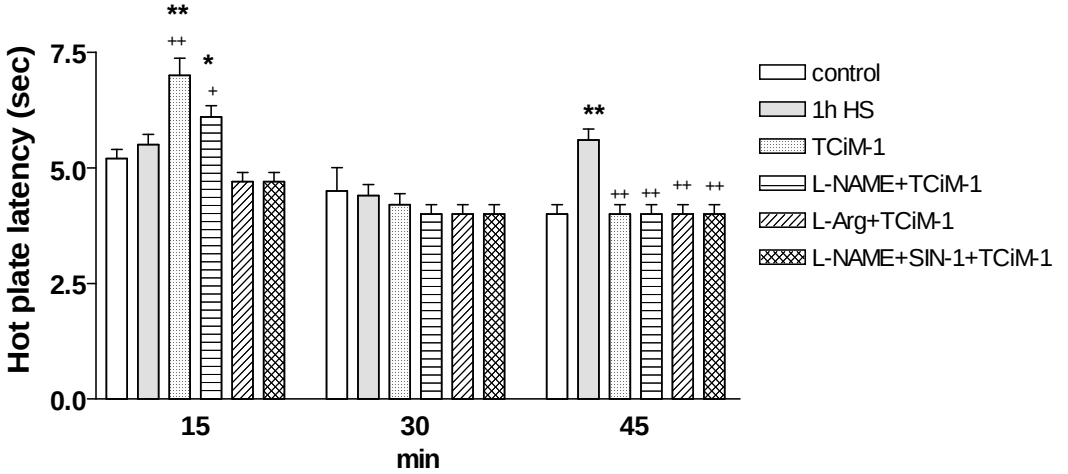
При съвместното въвеждане на L-NAME+Tyr-Cav-MIF-1 статистически достоверно увеличаване на болковия праг се наблюдаваше на 30 ($p<0.01$) и 45 мин ($p<0.01$) от изследването в сравнение с този на HS, докато на 15 мин. L-NAME

потенцираше ефекта на пептида, но нямаше ефект спрямо животните подложени на топлинен стрес (Фиг. 29).

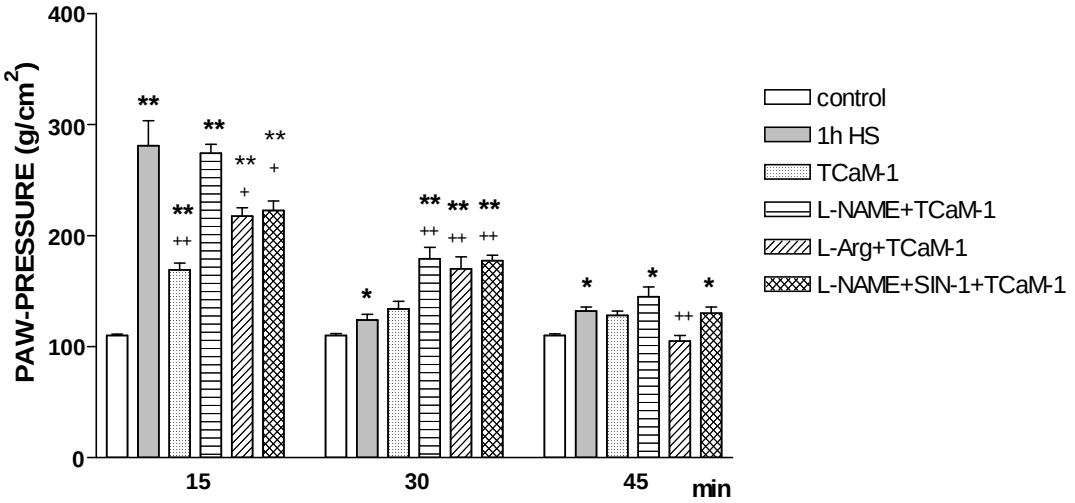
При въвеждане на комбинацията L-NAME с Tyr-Cit-MIF-1 или Tyr-Cav-MIF-1 се отчиташе статистически достоверно намаляване на HP-латентния период на топлинната стрес-индуцирана аналгезия на 45 мин. ($p<0.01$) (Фиг. 28 и Фиг. 30).



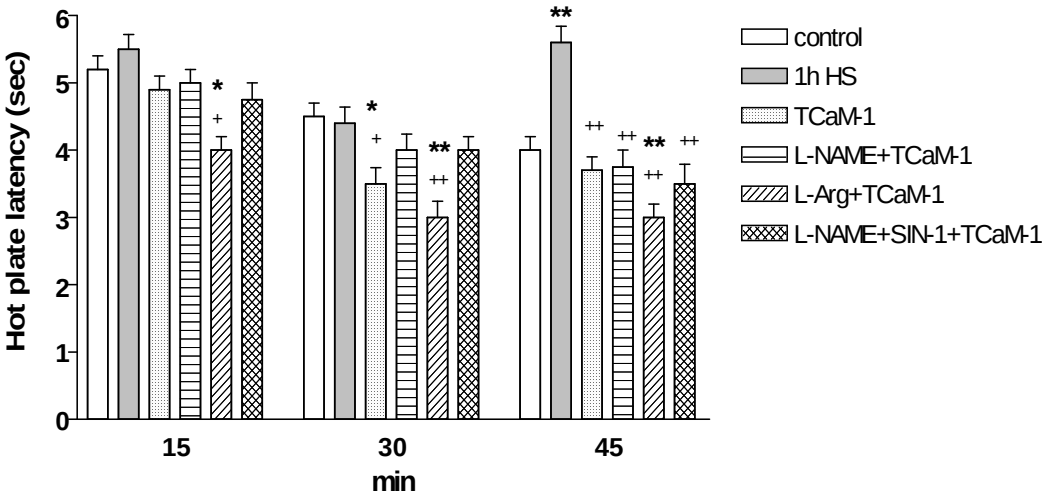
Фиг. 27. *Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 (TCiM-1, 1 mg/kg, i.p.) и съвместното му въвеждане с L-NAME (10 mg/kg, i.p.), L-Arg (1 mg/kg, i.p.) и L-NAME+SIN-1 (SIN-1 - 0,2 mg/kg, i.p.) върху топлинна стрес-индуцирана аналгезия (1h HS) в PP тест. Данните са представени като средни стойности* ï *S.E.M.; *P<0.05; **P<0.01 спрямо контрола; +P<0.05, ++P<0.01 спрямо 1h HS.*



Фиг. 28. *Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 (TCiM-1, 1 mg/kg, i.p.) и съвместното му въвеждане с L-NAME (10 mg/kg, i.p.), L-Arg (1 mg/kg, i.p.) и L-NAME+SIN-1 (SIN-1 - 0,2 mg/kg, i.p.) върху топлинна стрес-индуцирана аналгезия (1h HS) в HP тест. Данните са представени като средни стойности* ï *S.E.M.; *P<0.05; **P<0.01 спрямо контрола; +P<0.05, ++P<0.01 спрямо 1h HS.*



Фиг. 29. *Ефекти на Tyr-Cav-MIF-1 (TCaM-1, 1 mg/kg, i.p.) и съвместното му въвеждане с L-NAME (10 mg/kg, i.p.), L-Arg (1 mg/kg, i.p.) и L-NAME+SIN-1 (SIN-1 - 0,2 mg/kg, i.p.) върху топлинна стрес-индуцирана аналгезия (1h HS) в PP тест. Данните са представени като средни стойности* ï *S.E.M.; *P<0.05; **P<0.01 спрямо контрола;* $^{+}P<0.05$, $^{++}P<0.01$ *спрямо 1h HS.*



Ф иг. 30*. Ефекти на Tyr-Cav-MIF-1 (TCaM-1, 1 mg/kg, i.p.) и съвместното му въвеждане с L-NAME (10mg/kg, i.p.), L-Arg (1 mg/kg, i.p.) и L-NAME+SIN-1 (SIN-1 - 0,2 mg/kg, i.p.) върху топлинна стрес-индуцирана аналгезия (1h HS) в HP тест. Данните са представени като средни стойности* ï *S.E.M.;*P<0.05; **P<0.01 спрямо контрола;* $^{+}P<0.05$, $^{++}P<0.01$ *спрямо 1h HS.*

В нашите опити L-arginine беше въвеждан в доза 1 mg/kg, i.p. При съвместното въвеждане на L-arg+Tyr-Cit-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на топлинната стрес-индуцираната аналгезия на 15 ($p<0.01$) и 45 мин. ($p<0.01$) от изследването, докато при HP теста се наблюдаваше статистически

достоверно намаляване на HP-латентния период в сравнение с контролните стойности за HS само на 45 мин. ($p<0.01$) (Фиг. 27 и Фиг. 28).

При съвместното въвеждане на L-arg+Tyr-Cav-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на болковия праг и HP-латентния период на 15 ($p<0.01$), 30 ($p<0.01$) и 45 мин. ($p<0.01$) в сравнение с този на животните подложени на топлинен стрес (Фиг. 28 и Фиг. 30).

3.2. Участие на SIN-1 в аналгетичната активност на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 след едночасов топлинен стрес

В нашите опити SIN-1 беше въвеждан в доза 0, 2 mg/kg, i.p. При съвместното въвеждане на L-NAME+SIN-1+Tyr-Cit-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на болковия праг на 15 ($p<0.01$) и 45 мин. ($p<0.05$) и намаляване на HP-латентния период на 45 мин. ($p<0.01$) в сравнение с този на животните подложени на HS (Фиг. 27 и Фиг. 28).

При въвеждането на комбинацията L-NAME+SIN-1+Tyr-Cav-MIF-1 се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на болковия праг на 15 ($p<0.05$), 30 мин. ($p<0.01$) и 45 мин. ($p<0.01$) от изследването в сравнение с този на животните подложени на HS, а при HP теста - само на 45 мин. ($p<0.01$) в сравнение с контролните стойности за HS (Фиг. 29 и Фиг. 30).

Заключение:

Получените резултати показват, че:

- *Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 оказват влияние върху топлинната стрес-индуцирана аналгезия;*
- *Нитрикоксайдергичната система е въвлечена в механизма им на действие;*
- *При топлинния стрес в различна степен са въвлечени механо- и терморецепторите.*

V. ИЗУЧАВАНЕ ЕФЕКТИТЕ НА НЕВРОПЕПТИДИТЕ TYR-CIT-MIF-1 И TYR-CAV-MIF-1 ВЪРХУ ЛОКАЛИЗАЦИЯТА И ЕКСПРЕСИЯТА НА АЗОТНООКИСНАТА СИНТАЗА (NOS) В PERIAQEDUCTAL GRAY (PAG)

Известно е, че стресът повлиява невроендокринната, хормоналната и имунната функции на организма и отслабва ефектите на редица системи.

Един от механизмите, които вземат участие при стрес-отговора на организма е активирането на ендогенната опиоидна система.

Ендогенните опиоидни пептиди участват в различни функции на организма като хормони или невромодулатори (Lapo et al., 2003; Von Bohlen und Halbach & R. Dermietzel**.,** 2007).

Известно е, че по време на стрес се активира хипоталамо-хипофизно-адреналната (hypothalamo-pituitary-adrenal - HPA) ос. Променя се нивото на катехоламините, стимулира се експресията на ензима тирозинхидроксилаза, отговорен за тяхната синтеза (Yuksel.& Yurekli, 2003).

Също така, има данни, че азотният оксид (NO) играе важна роля при регулиране отговора на хипоталамо-хипофизно-адреналната ос към различни стресори (Uribe et al., 1999).

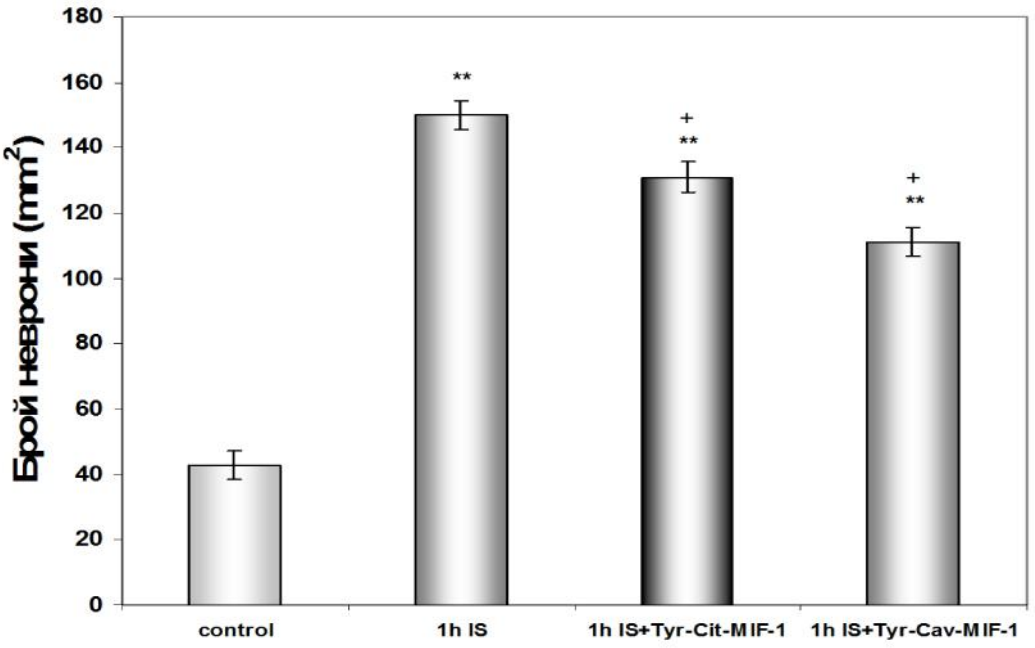
Редица експерименти показват, че азотноокисната система отговаря на всички изисквания за стрес-лимитираща система (Gilinskii et al., 2005).

Известно е, че азотноокисната синтаза е отговорна за синтеза на азотен оксид, който е важен за модулиране на болковата перцепция.

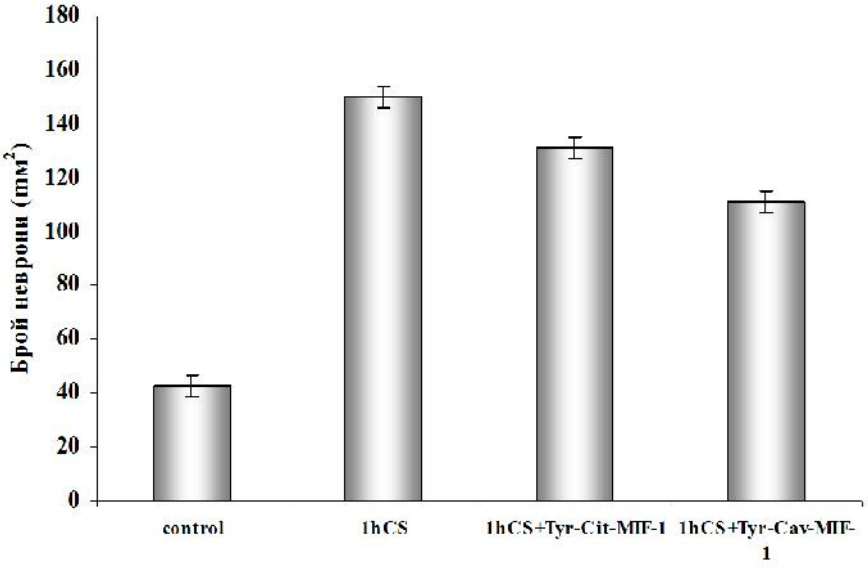
Ето защо ние си поставихме за цел да изучим влиянието на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 върху експресията на азотноокисната синтаза след три модела на стрес – имобилизационен, студов и топлинен.

Като обект за проучване избрахме periaqueductal gray (PAG) – основна структура свързана със стрес-индуцираната аналгезия. Стимулирането на опиоидните рецептори в PAG активира низходящите опиоидни и норадренергични инхибиторни пътища, подтискащи ноцицепцията.

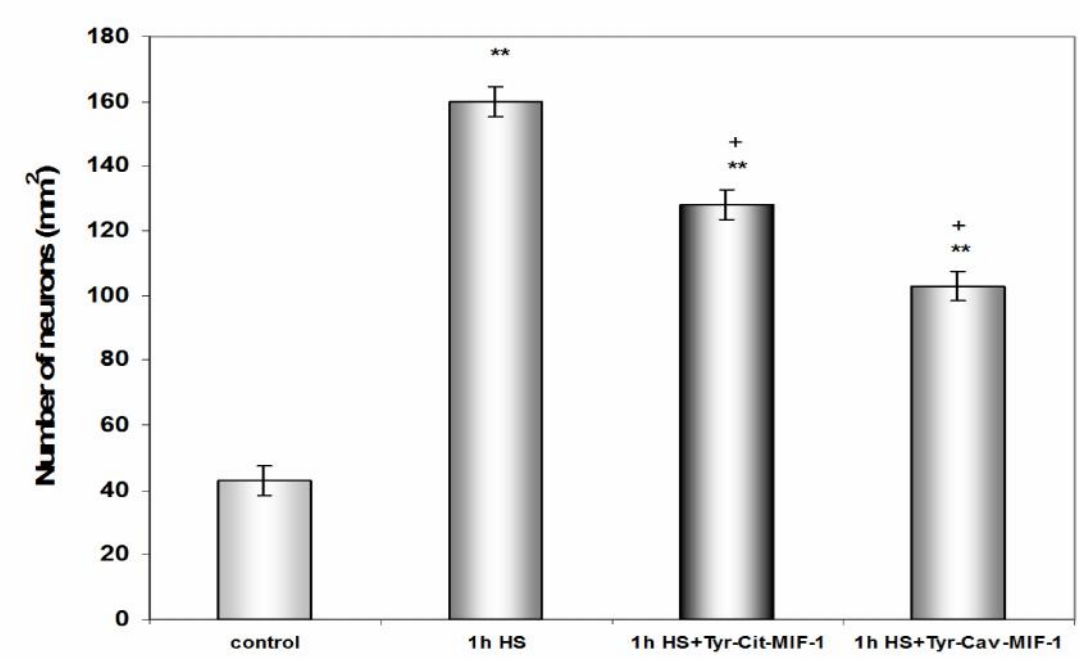
Използвани са мъжки плъхове порода Wistar (180-200g). След съответната стрес пороцедура животните бяха инжектирани с Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 и 15 мин по-късно бяха анестезирани с тиобарбитал.



Фиг. *31. Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 И Tyr-Cav-MIF-1 върху експресията на NOS в PAG след едночасов имобилизационен стрес (1h IS) . Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.;. *P<0.01, $^{+++}$P<0.001 спрямо контролата; **P<0.05 спрямо едночасов имобилизационен стрес.*



Фиг. *32. Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 И Tyr-Cav-MIF-1 върху експресията на NOS в PAG след едночасов стедов стрес (1h CS). Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.;. *P<0.01, $^{+++}$P<0.001 спрямо контролата; **P<0.05 спрямо едночасов имобилизационен стрес.*



Фиг. *33. Ефекти на Tyr-Cit-MIF-1 И Tyr-Cav-MIF-1 върху експресията на NOS в PAG след едночасов стедов стрес (1h HS). Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.;. *P<0.01, $^{+++}$P<0.001 спрямо контролата; **P<0.05 спрямо едночасов имобилизационен стрес.*

Резултатите показаха, че имобилизационният, студов и топлинен стрес статистически достоверно повишават експресията на nNOS в PAG на плъх спрямо контролата (Фиг. 31, 32 и 33).

Двата новосинтезирани пептида Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 бяха въведени след едночасов имобилизационен, студов или топлинен стрес (1h IS, 1h CS или по1h HS).

Получените резултати показаха, че пептидите понижиха експресията на NOS в PAG на плъх (Фиг. 31, 32 и 33).

Пептидът Tyr-Cav-MIF-1 потиска по-силно експресията на nNOS в PAG в сравнение с този на Tyr-Cit-MIF-1. (Фиг. 31, 32 и 33).

ОБСЪЖДАНЕ

През последните години стресът има огромно значение за живота на съвременния човек, тъй като той може да повлияе дадено заболяване, както и да предизвика такова. Известно е, че стресът се дефинира като състояние застрашаващо хомеостазата или дисхармония, на която организма противодейства с комплекс от физиологични и поведенчески отговори, които възстановяват равновесното му състояние (адаптивен стрес отговор) (Pacák & Palkovits, 2001).

Централната нервна система участва при стрес-отговора и е директно или индиректно въвлечена в поддържането на вътрешната хомеостаза (de Kloet, 1991, 2003, 2005; Tsigos & Chrousos, 1994; Armario, 2006).

За възстановяване на хомеостазата при стрес участват опиоидната, адренергичната, азотноокисната системи (Riedel et al., 2001). Азотноокисната и опиоидната системи са едни от основните, активиращи и участващи в антистресорната система (Riedel et al., 2000).

Освен това интерес представляват и пептидите, които са невромодулатори в ЦНС. Ето защо е важно изясняване участието им при стрес-индуцираната аналгезия.

Ендогенните невропептиди от семейството на Tyr-MIF-1 са MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 се отнасят към ендогенните антиопиоидни пептиди (AOP) (Cesselin F., 1995). Открити са в ЦНС като разпределението и специфичните им места за свързване съвпадат с разпределението на опиоидните рецептори. Те са способни да блокират опиоидподобни ефекти при специфични тест-системи и са изолирани от човешкия мозък. За тях е характерно, че в отличие от повечето опиоид-модулиращи пептиди, се свързват както с μ-опиоидните и рецептори, така и със собствени не-опиоидни места.

Синтезата на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 бе продиктувана от необходимостта да се търсят аналози на Tyr-MIF-1 с по-силни аналгетични ефекти и евентуално по-изразена антистресорна активност.

В литературата до този момент механизмите лежащи в основата на аналгезията предизвикана от имобилизационен, студов и топлинен стрес не са достатъчно изучени.

Няма данни за ефектите на Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 върху стрес-индуцираната аналгезия, както и за участието на опиоидната и азотноокисната система в тях.

В дисертационният труд за измерване на ноцицептивните прагове бяха използвани два теста – с механичен стимул (PP) и с термичен стимул (HP). Ноцицептивните измервания бяха проследени във времето и до затихване на ефекта до контролни стойности.

Определени бяха промените в локализацията и експресията на азотноокисната синтаза и броя на NADPH-d-реактивните неврони в PAG след три модела на стрес, както и повлияването им от Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1.

Целта на проведените изследвания е да се изучат ефектите и някои механизми на изследваните пептиди при стрес-индуцирана аналгезия.

Изследваните пептиди бяха инжектиране в доза (1mg/kg, интраперитонеално). Дозата е подбрана след направена доза-отговор крива.

Получените резултати показаха, че при двата използвани теста Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 имат аналгетични ефекти, по-силни от този на Tyr-MIF-1. От двата пептида по-силен аналгетичен ефект показа Tyr-Cav-MIF-1.

Аминокиселините L-canavanine, L-ornitine, L-citruline притежават аналгетични ефекти, доктато L-canaline реверсира болковата реакция до хипералгезия (Brakadanska, 2001; Bocheva et al., 2005). Добре известно е, че канаванинът е природна аминокиселина от растителен произход, структурен аналог и ефективен антиметаболит на аргинина, в молекулата на който метиленовата група от страничната група е заменена с кислороден атом (Rosenthal et al, 1975).

Цитрулинът се явява ключово междинно съединение в урейния цикъл-основен път за екскреция на токсичния NH_3 при бозайниците. Съществува предимно в черния дроб, където е включен в пътя на детоксикацията. Тази неесенциална аминокиселина се образува в урейния цикъл чрез добавяне на NH_3 и CO_2 към орнитина. В хода на реакцията в комбинация с аспартиновата кислина се образува аргинин-сукцинова кислина, която на свой ред по-късно метаболизира в аминокиселината аргинин-реакция, катализирана от NOS. Аргининът най-напред се окислява до N-hydrohyl-arginine, който в последствие се окислява и се превръща в цитрулин съпроводено с отделяне на азотен оксид. Следователно, цитрулинът е не само прекурсор на аргинина, но е аминокиселина, която не е компонент в повечето протеини и ензими. Той може да се превърне отново в L-аргинин след включване в молекулата му на

един азотен атом, който помага за преодоляване на умората и стресса (Coenen et al., 2007). Освен това предизвиква вазодилатация, която подобрява кръвоснабдяването и тъканото снабдяване с кислород, повишава и нивото на азотния оксид, който се използва от мускулите.

В опити с въвличане на механо- и терморецепторите бяха изучени аналгетичните ефекти на амнокиселините L-canavanine, L-arginine, L-ornitine, L-citrulline и L-canaline. Изследваните аминокиселини притежават изразени аналгетични ефекти, с изключение на L-canaline, който реверсира болковата реакция до хипералгезия (Brakadanska, 2001; Bocheva et al., 2005).

Инкорпорирането на L-canavanine в молекулата на късоверижните пептиди киотрофин и MIF-1 води до статистически достоверно потенциране на аналгетичните им ефекти, които са налоксон-обратими (Bocheva & Dzambazova-Maximova, 2004a; Bocheva et al, 2005).

Известно е, че аналгезията предизвикана от стрес е феномен, наречен стрес-индуцирана аналгезия, която може да бъде предизвикана от имобилизация, ниска или висока температура, социални стресори (Miczek et al., 1982; Teskey et al., 1984; Lester & Fanselow, 1985; Kavaliers & Innes, 1987; Kavaliers, 1990; Kavaliers & Colwell, 1991).

Резултатите от нашето изследване показаха, че едночасовият имобилизационен, студов или топлинен стрес повишават болковия праг и удължават HP-латентността, които са в подкрепа на литературните данни (Amir & Amit, 1978; Appelbaum & Holtzman, 1985; Aloisi et al., 1998; Galina & Kastin 1987; Kavaliers, 1987).

Един от механизмите за аналгезията е, че стресът предизвиква отделяне на опиоидни пептиди, водещи до антиноцицептивни ефекти (Inoue et al., 2003). Известно е, че след 1 часов имобилизационен студов или топлинен стрес отделените ендогенни опиоидни пептиди частично са въвлечени в стресовия отговор потискайки обратното захващане на норадреналин в мозъка, в хипоталамуса и амигдалата на плъх, като Мет-енкефалина има най-силен ефект върху този процес в началните фази на стреса (Tanaka et al., 1985).

До сега няма данни за ефектите на Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 върху имобилизационна, студова и топлинна стрес-индуцираната аналгезия.

В настоящото изследване беше показано, че Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 имат ефекти върху трите вида стрес-индуцираната аналгезия, изразяващи се в намаляване на болковия праг и HP-латентността.

От литературните данни е известно, че опиоидната и неопиоидната компонента при стрес-индуцираната аналгезия участват различно при имобилизационния, студов или топлинен стрес. По-голям дял при студовия стрес има неопиоидната компонента, докато опиоидната - при топлинния стрес. При имобилизационния стрес двете компоненти имат почти равно участие (Pacak, K. & M. Palkovits, 2001). Получените резултати могат да бъдат обяснени с фактът, че различните стресогенни фактори - имобилизация, висока или ниска температура модулират ендогенната опиоидна система за която е известно, че е част от антистресорната система (Pacák & Palkovits, 2001).

Известно е, че Tyr-MIF-1 има както опиоидни, така и неопиоидни ефекти. В мозъчни синаптични плазмени мембрани е открито място с висок афинитет, което се насища и е специфично за Tyr-MIF-1 (Zadina & Kastin, 1986).

Най-високи са концентрации на Tyr-MIF-1 в кората, стриатума и амигдалата, а ниски – в моста и медулата, макар че и те са няколко пъти по-високи от откритите в ПНС. Освен към собствен свързващ участък в мозъка, Tyr-MIF-1 се свързва по-слабо, но относително селективно, към μ-опиоидните рецептори, като афинитетът е 400-700 пъти по-висок към тях, в сравнение с κ-рецепторите (Zadina et al., 1992).

Литературни данни показват, че Tyr-MIF-1 въведен интрацеребро-вентрикуларно в плъхове променя плазмените нива на неврохипофизалните хормони и кръвното налягане. За Tyr-MIF-1 съществува насищаща се система за транспорт от мозъка към кръвта (Banks et al., 1993; Banks & Kastin, 1994, 1997).

Както е известно, стресът предизвиква отделяне на опиоидни пептиди, водещи до стрес-индуцирана аналгезия (Teskey et al., 1984; Lester & Fanselow, 1985; Kavaliers & Innes, 1987; Kavaliers, 1990; Kavaliers & Colwell, 1991).

Тъй като са противоречиви данните за участието на опиоидната система в механизмите на SIA, в настоящата работа беше изучено участието на неселективния опиоид-рецепторен антагонист налоксов в имобилизационно-, студово- и топлинно предизвикана аналгезия, както и в ефектите на двата изследвани пептида при интактни животни и на фона на стрес. Получените резултати показаха, че опиоидергичната невромедиаторна система участва:

1. в аналгетичните ефекти на Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 при интактни животни;
2. при имобилизационна, студова и топлинна стрес-индуцирана аналгезия;
3. в ноцицептивните ефекти на двата пептида след едночасов имобилизационен, студов или топлинен стрес.

Някои автори показват, че налоксонът при tail-flick и hot-plate редуцира инхибицията на отговорите при имобилизационен стрес, което показва участието на опиоидните рецептори (Amir и Amit, 1978).

В други изследвания е показано, че тойl не променя латентния период т.е. опиоидните рецептори не участват в ноцицептивния отговор (Kiyatkin, 1989).

Според трети автори налоксонът няма ефект върху студовата стрес-индуцирана аналгезия (Kavaliers, 1987), но когато е въведен преди студовия стрес той блокира дозо-зависимо аналгезията (Vaswani et al., 1988).

В нашите експерименти, налоксонът подтисна аналгезията предизвикана и от трите вида стрес и при двата теста в различна степен, но не и до контролното ниво.

Последни литературни данни сочат, че SIA категоризирана като опиоидна и неопиоидна (Vaswani et al., 1988; Tsuda et al., 1989; Inoue et al., 2003) не съществува в чист вид. Тя основно има смесен характер и се състои от опиоидна и неопиоидна компоненти, но в различно съотношение (Tsuda et al., 1989; Pacák & Palkovits, 2001; Inoue et al., 2003; Lapo et al., 2003).

Получените от нас резултати потвърждават различното съотношение опиоидна/неопиоидна компонента в SIA. При студов стрес е застъпена предимно неопиоидната компонента, при топлинен стрес – опиоидната, докато при имобилизационния стрес двете системи са приблизително еднакво застъпени (Pacák & Palkovits, 2001; Bocheva & Dzambazova-Maximova, 2009).

Получените резултати показаха, че налоксонът понижава аналгетичните ефекти на Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 през целия период на изследването и при двата ноцицептивни теста.

Освен опиоидергичната, *азотноокисната системата* също участва в ноцицептивните ефекти на Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1.

В достъпната ни литература не намерихме данни за участието на азотноокисната система в аналгетичните ефекти на Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1, както и в ефектите на двата изследвани пептида върху трите вида стрес.

Получените от нас резултати показаха, че при инжектиране на L-NAME или L-Arg преди Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1, ефектите върху имобилизационен, студов или топлинен стрес са различни при двата ноцицептивни теста.

Известно е, че стресът активира хипоталамо-хипофизо-адреналната (hypothalamic-pituitary-adrenal - HPA) ос. Някои автори показват, че HPA отговорите

към стрес могат да се модулират и от азотния оксид (Gilinskii et al., 2005; Uribe et al., 1999; Gupta. et al., 2005).

Литературни данни показват, че азотният оксид повлиява ноцицептивните ефекти индуцирани от имобилизационен стрес (Knowles & Moncada, 1994; Gupta, V. et al., A. 2005).

Морфологични изследвания доказват съществуването на сигнални пътища между опиоидергичната и азотноокисната система в хипоталамуса на плъх (Von Bohlen und Halbach & Dermietzel, 2007).

Нашето предположение относно различията в получените резултати за участието на азотноокисната система в ефектите на двата пептида инжектирани веднага след всеки един от стресовете е, че те биха могли да бъдат обяснени с различното взаимодействие на двата пептида с μ-рецепторите от една страна, както и с различното участие на опиоидната и неопиоидната компонента в трите вида модела на стрес от друга страна.

Важен е фактът, че азотноокисната система повлиява в различна степен не само опиоидната, но и неопиоидна компонента при имобилизационния, студов и топлинен стресове.

Както вече отбелязахме опиоидната и неопиоидната компонента участват различно при имобилизационен, студов и топлинен стрес. Неопиоидната компонента участва предимно при студовия стрес, а опиоидната - при топлинния стрес. Двете системи имат почти равно участие при имобилизационния стрес (Pacak & Palkovits, 2001).

Получените резултати показват въвличане на опиоидните рецептори, азотния оксид и вторичните посредници в механизма на действие на Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 и при трите вида стрес – имобилизационен, студов и топлинен.

Азотният оксид действа като невромедиатор в ЦНС и участва в модулирането на болката (Garthwaite, 1991; Snyder & Bredt, 1992). Повечето ноцицептивни рефлекси включват взаимодействието му с глутаматните NMDA рецептори. Установено, че синтезата на азотен оксид усилва аферентния сигнал предаван от гръбначния мозък към кортекса и впоследствие изразен в поведенчески отговор (Mayer et al., 1999).

Стресът предизвиква биохимични промени засягащи болковия праг и поведението. Литературните данни показват, че азотният оксид е тясно свързан със SIA (Yamada et al., 1995; Vincent & Kimura, 1992; Esch et al., 2002). Редица експерименти показват, че NO системата е *стрес-лимитираща* (Gilinskii et al., 2005).

Модулиращата роля на азотният оксид в механизмите на SIA е доказана при опити, в които плъховете са претретирани с L-NAME, като е установено удължаване на tail-flick латенцията и потенциране на имобилизационната стрес-индуцирана аналгезия (Hăulică et al., 1997).

Стресът и азотният оксид оказват увреждащо действие, което зависи от продължителността на отделянето му, количеството на продукцията и типа на синтезираните NO молекули. От друга страна NO противодейства на норадреналиновата активност и симпатиковия отговор, инхибирайки освобождаването на моноаминните трансмитерни молекули т.е. участват авторегулаторни пътища, въвличащи различни сигнални молекули като опиоиди и ендоканабиноиди (Esch et al., 2002).

Известно е, че NMDA рецепторите играят важна роля в контрола на HPA оста под влияние на двойствена роля на NO (Riedel & Neeck, 2001). От една страна той може да потенцира стимулиращия ефект на невроналния IL-1 и да увели освобождаването на CRH и NO най-вероятно чрез цГМФ. От друга страна NO може да превантира свръхстимулацията на тази невронална верига чрез способността му да окислява редокс-чувствителното място на NMDA рецептора и така да намали освобождаването на CRH и NO.

Tyr-MIF-1 е широко разпространен в мозъка, като най-високи концентрации са намерени в кора, стриатум и амигдала, а по-ниски в моста и медулата. Най-висока е Tyr-MIF-1-активността в мозъка, епифизата и хипоталамуса, следвана в таламуса, стриатума, хипокамп, малък мозък, кора и среден мозък (Banks & Kastin, 1994). Tyr-MIF-1 има насищаща се система за транспорт от мозъка към кръвта, специфична за Tyr-MIF-1 и Met-енкефалин (Banks & Kastin, 1994).

Изолиран е от париетална част на кората на нормален човешки мозък (Horvath & Kastin, 1990) и от говежди хипоталамус (Horvath & Kastin, 1989). Tyr-MIF-1 се разгражда в плазмата *in vivo* и *in vitro* (Kastin et al., 1994).

Tyr-MIF-1 повлиява редица невротрансмитерни системи като опиоидна, азотноокиснаа, хистамин- и адренергична (Zamfirova et al., 2001., Bocheva et al. 2003). Всичко това подчертава, че Tyr-MIF-1 модулира опиоидни и неопиоидни невротрансмитерни мрежи, което помага на стресирания организъм за достигане на хомеостазното ниво.

Известно е, че Tyr-MIF-1 повлиява стрес-индуцираната аналгезия предизвикана от имобилизационен, топлинен и студов стрес (Bocheva & Dzambazova-Maximova, 2004a,b).

Съгласно литературни данни концентрациите на АСТН и на CORT са едни от маркерите за стрес (Koko et al., 2004, Armario, 2006; Sinha, 2007). Известно е, че при стрес хипоталамусът контролира секрецията на АСТН от предния дял на хипофизата, който на свой ред стимулира адреналната секреция на глюкокортикоиди, главно CORT при плъхове (Tsigos & Chrousos, 1994, 2002).

Наши предишни резултати показаха, че и трите модела на стрес повишават статистически достоверно нивата на АСТН и CORT в плазмата, но в различна степен (Bocheva et al., 2008). Плазмените нива на АСТН и CORT бяха най-високи и най-продължителни във времето при имобилизационния стрес, а при студовия стрес нивата на изследваните хормони бяха по-ниски, като ефектът бе и по-краткотраен. Тези резултати се в унисон с литературни данни, според които стресорите активират хипофизата и надбъбречната кора, които са функционални части от HPA оста (Marti et al., 1994).

Плазмените концентрации на АСТН и CORT се повишават под влияние на всички стресори, но най-интензивно повишаване, се наблюдава при топлинен стрес, следван от имобилизационния, докато при студовия повишаването е най-слабо.

Нашите данни потвърждават специфичността на стрес-реакцията, която зависи от характера на стресора и все по-широко застъпваната в литературата концепция, според която всеки тип стресор има собствен централен неврохимичен и периферен невроендокринен «подпис», с различни количествени и качествени механизми (Goldstein et al., 1996; Djordjevic et al., 2003; 2007; Bocheva et al., 2008; Bocheva & Dzambazova, 2009).

Както е добре известно, глюкокортикоидите играят ключова роля в регулацията на активността на HPA ос и прекратяването на стрес отговора, чрез действие върху извънхипоталамични регулаторни центрове, хипоталамус и хипофиза имащи за цел да предпазят организма срещу ефекта на стресора и да фокусират енергията за възвръщане на хомеостазата (de Kloet, 1991, 2003, 2005).

Най-вероятно Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 притежават антистресорен ефект, може би те понижават повишените нива на АСТН и CORT в плазмата. Точните механизми са неясни. Ето защо са необходими бъдещи изследвания за определяне на съответни рецептори и сигнални пътища.

За да изучим ефектите на Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 върху стреса и по-конкретно как повлияват експресията nNOS, която е отговорна за синтеза на азотния оксид (продукт важен за модулиране на болковата перцепция и стреса), ние

си поставихме **за цел да** изучим ефектите на двата пептида върху nNOS и NADPH-d-невроните. Известно е, че NADPH-d е хистохимичен маркер за нитрергични неврони (Wolf, 1997).

За хистохимичните експерименти избрахме PAG на плъх. Имунохистохимично оцветяване за nNOS (Bredt & Snyder, 1990) или хистохимични изследвания за редуцирана NADPH-d (Hatakeyama et al., 1996; Krukoff & Khalili, 1997; Shirakawa et al., 2004) показват, че nNOS неврони са разположени в PAG известен център на стрес-отговора в мозъка, съдържащ и умерено количество Tyr-MIF-1 (Vincent & Kimura, 1992; Calzà et al., 1993; Kishimoto et al., 1996; McLeod et al., 2001; Hori et al., 2005). Неврони съдържащи nNOS има и в хипоталамус на плъх (McCann et al., 1988) и хора (Thorns et al., 1998).

В литературата няма данни за промени в плътността на nNOS и NADPH-d неврони в PAG на плъх при трите вида стрес, както и за ефектите на двата пептида.

Получените от нас резултати показаха, че имобилизационният, студовият и топлинен стрес повишиха броя на nNOS и NADPH-d-реактивни неврони в PAG на плъх, което говори за една повишена NO активност (Scherer-Singler et al., 1983).

Съществуват достатъчно доказателства, че стресът е свързан със синтез на NO, катализиран от NOS (McLeod et al., 2001; Masood et al., 2004). Има данни, че NO играе важна роля при регулиране отговора на HPA ос към различни стресори (Uribe, R. et al., 1999).

Получените от нас резултати корелират с данните на редица автори показващи, че имобилизационният стрес повишава експресията на nNOS-позитивни неврони в PAG и че NO е тясно свързан с регулацията на HPA оста (Calzà et al., 1993; Hatakeyama et al., 1996; Kishimoto et al., 1996; Krukoff & Khalili, 1997; Hori et al., 2004). Дали действието му е индиректно чрез други невромодулатори или директно чрез неврони съдържащи едновременно CRH и NO остава неясно до този момент (Gotti et al., 2005).

Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 въведени след едночасов имобилизационен, студов или топлинен стрес понижиха броя на nNOS и NADPH-d-реактивни неврони в PAG на плъх. Tyr-Cav-MIF-1 потиска в по-голяма степен експресията на nNOS в сравнение с тази на Tyr-Cit-MIF-1.

В морфологични изследвания е показано, че съществуват сигнални пътища между опиоидергичната и NO системата в PAG на плъх (Uribe et al., 1999; Gilinskii et al., 2005; Gupta et al., 2005).

Може би това е един от пътищата по който даден опиоиден пептид регулира индиректно активността на HPA оста. Потенцира се освобождаване на ендогенни опиоиди, образуването на NO, който чрез блокиране на редокс-чувствителните места на NMDA рецепторите може да окаже инхибиторен ефект върху CRH-невроните и по този начин да намали отделянето на CRH-основната молекула управляваща отговора на HPA при стрес (Johnson et al., 1992; Dallman, 1993, 2000; Cullinan et al., 1995; Peñalva, 2002).

Втори потенциално възможен механизъм чрез който пептидите могат индиректно да повлиява магноцелуларната система е чрез опиоидните пептиди експресирани в окситоцин- и вазопресин-съдържащите неврони, които намаляват освобождаването на неврохипофизните хормони (Martin & Voigt, 1981; Watson et al., 1982).

По-силният ефект на Tyr-Cav-MIF-1 най-вероятно се дължи на факта, че аминокиселината канаванин преминава кръвно-мозъчната бариера и е инхибитор на аргинина (Rosenthal, 1972; 1977).

Предполагаме, че двата пептида въведени интраперитонеално се свързват с периферните рецептори и предизвикват отделяне на ендогенни опиоиди. Така сигналът се предава в ЦНС и се повлиява стрес-лимитиращата NO система, като по индиректен начин може би повлияват CRH-невроните.

Повишената NO активност при инжектиране на Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 след стрес корелира с повишената им болкова чувствителност. Ключова роля в тези ефекти най-вероятно имат глутаматните NMDA рецептори, които освен основна роля в централните ноцицептивни механизми, са свързани и с регулацията на HPA ос.

ИЗВОДИ

1. Базалната ноцицепция бе повишена след едночасов имобилизационен, студов и топлинен стрес и след въвеждане на изследваните пептиди;

2. Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 повишиха болковия праг и HP-латенцията в сравнение с останалите аналози;

3. Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 понижиха имобилизационната, студова и топлинна SIA при двата използвани теста;

4. Налоксонът и MB подтиснаха ефектите на Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 в интакти животни и при имобилизационната, студова и топлинна SIA, което показва участие на опиоидергичната система;

5. L-NAME, SIN-1 и L-Arg в комбинация с Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 въведени след трите вида стрес понижиха имобилизационната, студова и топлинна стрес-индуцирана аналгезия и при двата теста, което показва участие на азотноокисната система;

6. Стресът индуциран от имобилизация, ниска или висока температура повиши броят на NADPH-d-реактивните неврони и експресията на nNOS и в PAG в сравнение с контролната група животни;

7. Въведини на фона на стресс Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 понижиха в различна степен броят на NADPH-d-реактивните неврони, както и експресията на nNOS в PAG. Tyr-Cav-MIF-1 показа по-силен ефект в сравнение с този Tyr-Cit-MIF-1;

8. Получените резултати от *in vivo* и *in vitro* изследванията подчертават връзката между опиоидните пептиди и азотноокисната система в мозък на плъх.

ПРИНОСИ

Установено е, че:

1. Инкорпорирането на аминокиселините, цитрулин и канаванин в молекулата на пептида Tyr-MIF-1 повиши аналгетичния ефект на новосинтезираните Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 пептиди в сравнение с този на Tyr-MIF-1;

2. Аналгетичните ефектите на Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 са по-ниски от тези на аминокиселините L-canavanine и L-citruline;

3. Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 понижават имобилизационната, студова и топлинна стрес-индуцирана аналгезия при двата използвани теста;

4. Опиоидергичната и азотноокисната система са въвлечени в ефектите на Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 след имобилизационен, студов и топлинен стрес;

5. Tyr-Cav-MIF-1 и Tyr-Cit-MIF-1 въведени след трите вида стрес понижават броя на NADPH-d-реактивни неврони и експресията на nNOS в PAG на плъх;

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Власковска М. Л. Казаков, В. Мицов Опиоидни пептиди. В: Невротрансмитери и невромодулатори. Медицина и физкултура, София, 1989, 128-162.

2. Ahlin P., J. Kristl A., Vrecer G. Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration. Int. S. Pharm., 2002, 239, 113-120.

3. Aimone L.D., Bauer C.A., Gebhart G.F. Brain-stem relays mediating stimulation-produced antinociception from the lateral hypothalamus in the rat. J. Neurosci., 1988, 8, 2652-2663.

4. Akil H., Madden J, Patrick R.L., Barchas J.D. Stress-induced increase in endogenous opiate peptides: concurrent analgesia and its partial reversal by naloxone. In: Kosterlitz, H.W. (Ed.), Opiates and Endogenous Opioid Peptides. Elsevier, Amsterdam, 1976a, 63-70.

5. Akil H., Mayer D.J., Liebeskind J.C. Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. Science, 1976b, 191, 961-962.

6. Akil H., Mayer D.J., Liebeskind J.C. Comparison in the rat between analgesia induced by stimulation of periacqueducal gray matter and morphine analgesia. C.R. Acad. Sci.Hebd. Seances Acad. Sci. D., 1972, 274, 3603-3605.

7. Akil H., Watson S.J., Young E., Lewis M.E., Khachaturian H., Walker J.M. Endogenous opioids: biology and function. Ann. Rev. Neurosci., 1984, 7, 223-255.

8. Akil H., Young. E., Walker J.M., Watson S.J. The many possible roles of opioids and related peptides in stress-induced analgesia. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1986, 467, 140-153.

9. Akirav I., Raizel H., Maroun M. Enchancement of conditioned fear extinction by infusion of the GABA agonist muscimol into the rat prefrontal cortex and amygdala. Eur. J. Neurosci., 2006, 23, 758-764.

10. Al Amin H.A., Atweh S.F., Jabbur S.J., Saade N.E. Effects of ventral hippocampal lesion on thermal and mechanical nociception in neonates and adult rats. Eur. J. Neurosci., 2004, 20, 3027-3034.

11. Aloisi A. M. Sex differences in pain-induced effects on the septo-hippocampal system. Brain Res., 1997, 25, 397-406.

12. Aloisi A.M., Ceccarelli I., Lupo C. Behavioural and hormonal effects of restraint stress and formalin test in male and female rats. Brain Res Bull 1998, 47(1): 57-62.

13. Alyaudin R.N, Gothier D., Petrov V. et. al. Analgestic activity of the hexapeptide delargin absorbed on the surface of polysorbate 80-coated pol (butylcyanoacrylate) nanoparticles. Eeur. J. Pharm. Biopharm., 1995, 41, 44-48.

14. Alyaudin R.N., reichel a., löbenberg r, Ramge P, Kreuter J, Begley DJ. Interaction of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles with the blood-brain barrier in vivo and in vitro. J. Drug Target., 2001, 9, 209-221.

15. Amir S., Amit Z. Endogenous opioid ligands may mediate stress-induced changes in the affective properties of pain related behavior in rats. Life Sci 1978, 23: 1143-1151.

16. AMIT Z., GALINA Z.H. Stress-induced analgesia: adaptive pain suppression. Physiol. Rev., 1986, 66, 1091-1120.

17. APPELBAUM B.D., HOLTZMAN S.G. Restraint stress enhances morphine-induced analgesia in the rat without changing apparent affinity of receptor. Life Sci 1985, 36: 1069–1074.

18. ARMARIO A. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? CNS Neurol. Disord. Drug Targets., 2006; 5(5), 485-501.

19. BANKS W.A., A.J. KASTIN, C.A. Ehrensing. Measurement of transport of cytokines across the blood – brain barrier. In: Neurobiology of Cytokine, part A., Academic Press, San Diego, 1993, pp 67-77

20. BANKS W.A., KASTIN A.J.. Measurement of efflux rates from brain to blood. In Mehods in Molecular Biology, Neuropeptide Protocols (Irvine G.B. and Williams C.H. eds); 1997, Vol 73, p.p. 353-360.

21. BANKS W.A., KASTIN, A. Opposite direction of transport across the blood – brain barrier for Tyr-MIF -1 and MIF -1; comparison with morphine. Peptides, 1994, 15(1), 23-29.

22. BANKS WA. Physiology and pathology of the blood-brain barrier: implications for microbial pathogenesis, drug delivery and neurodegenerative disorders. J Neurovirol., 1999, 5(6):538-55.

23. BASBAUM A.I., FIELDS, H.L. The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: further studies on the anatomy of pain modulation. J. Comp. Neurol., 1979, 187, 513-531.

24. BEHBEHANI M.M. The role of acetylcholine in the function of the nucleus raphe magnus and in the interaction of this nucleus with the periaqueductal gray. Brain Res., 1982, 252, 299-307.

25. BEHBEHANI M.M., PARK, M.R., CLEMENT, M.E. Interactions between the lateral hypothalamus and the periaqueductal gray. J. Neurosci., 1988, 8, 2780-2787.

26. BLACK K.L., NINGARAJ N.S.. Modulation of brain tumor capillaries for enhanced drug delivery selectively to brain tumor. Cancer Control., 2004, 11, 165-173.

27. BLEDNOV Y.A., STOFFEL M., ALVA H, HARRIS R.A. A pervasive mechanism for analgesia:activation of GIRK2: channels. Proc. NAtl. Acad. Sci. U.S.A., 2003, 100, 277-282.

28. BLESSING W.W. Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. Cell.Mol. Neurobiology, 2003,. 23, 527-538.

29. BOCHEVA A, DZAMBAZOVA E, HADJIOLOVA R, TRAIKOV L, MINCHEVA R, BIVOLARSKI I. Effect of Tyr-MIF-1 peptides on blood ACTH and corticosterone concentration induced by three experimental models of stress. Auton Autacoid Pharmacol., 28(4), 117-23, 2008.

30. BOCHEVA A., DZAMBAZOVA-MAXIMOVA E., PAJPANOVA T. Effects of L-canavanine, L-arginine, L-ornithine, L-citrulline and L-canaline on pentylenetetrazole seizures. Coll. Symp. Ser., 8, 10-11, 2005.

31. BOCHEVA A., DZAMBAZOVA-MAXIMOVA E. Effects of Melanocyte-inhibiting factor (MIF-1) on analgesic effects of amino acids L-arginine, L-ornithine and L-citrulline in rats. Compt.Rend.Bulg.Acad.Sci., 2004a, 57(1): 103-108.

32. BOCHEVA A., E. DZAMBAZOVA. Involvement of endogenous nitric oxide in the effects of Tyr-W-MIF-1 and Tyr-K-MIF-1 after three models of stress. Compt Rend Acad Bulg Sci, 61(2), 261-268, 2008.

33. BOCHEVA A., E. DZAMBAZOVA-MAXIMOVA, N. LAMBADJIEVA. Interaction between peptides of Tyr-MIF-1 family, morphine and nitric oxide in nociception. Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci., 2004, 57(3), 97-102.

34. BOCHEVA A., E. DZAMBAZOVA-MAXIMOVA, T. PAJPANOVA. Is nitric oxide involved of in the antinociceptive effects of kyotorphin, Tyr-Cav and MIF's analogues in rats? Coll Symp Ser., 2003; 6:1-3.

35. BOCHEVA A., E. DZAMBAZOVA-MAXIMOVA. Antiopioid properties of the Tyr-MIF-1 family. Meth.Find.Clin.Exp.Pharmacol., 2004b, 26(9), 673-677.

36. BOCHEVA A., E. DZAMBAZOVA-MAXIMOVA. Effects of Tyr-MIF's of peptides on mmobilization stress-induced antinociception in rats. Folia Medica, 2004, 46(2):42-6.

37. BOCHEVA A., E. DZAMBAZOVA-MAXIMOVA. Opioidergic system and second messengers affected the nociceptive effects of Tyr-MIF-1's after three models of stress. Bulg Chem Commun., 2009, 41, 2, 153-159.

38. BOCHEVA A., S. BELCHEVA, S. PANCHEVA, T. PAJPANOVA, V. PETKOV. Effects of the melanocyte-inhibiting factor, of its newly-synthesized analogue and of morphine on the nociception in rats. Bulg. Chem.Commun. 2001a, 33, 1, 83-87.

39. BOCHEVA A., W. SCHUNACK, R. ZAMFIROVA, M. GEORGIEVA, S. TODOROV. Involvement of H_3-receptors in the antinociceptive action of the endogenous neuropeptides kyotorphin and Tyr-MIF-1 Bulg.Chem.Commun., 2001b, 33(1): 119-125.

40. BODNAR R.J., COMMANS K.G., PFAFF D.W. Gender differences in analgesia. In: Central neural states relating sex and pain, John Hopkin University Press, Baltimore, 2002.

41. BODNAR R.J., MERRIGAN K.P., SPERBER, E. Potentiation of cold-water swim analgesia and hypothermia by clonidine. Pharmacol. Biochem. Behav, 1983, 19, 447-451.

42. BODOR N. Recent advances in retrometabolic drug design and targeting approaches. Pharmazie, 2000, 55, 163-166

43. BODOR N., BUCHWALD P. Barriers to remember: brain-targeting chemical delivery systems and Alzheimer's disease. Drug Discov. Today, 2002, 7, 766-774.

44. BODOR N., BUCHWALD P. Brain-targeted drug delivery: experiences to date. Am. J. Drug Deliv. 2003, 1, 13-26.

45. BOUHASSIRA D., BING Z., LE BARS D. Effects of lesion of locus coeruleus/subcoeruleus on diffuse noxious inhibitory controls in the rat. Brain. Res., 1992a, 571, 140-144.

46. BOUHASSIRA D., CHITOUR D., VILLANEUVA L., LE BARS D. Studies of brain structures involved in diffuse noxious inhibitory controls in the rat: the rostral ventromedial medulla. J. Physiol, 1993, 463, 667-687.

47. BOUHASSIRA D., CHITOUR D., VILLANEUVA L., LE BARS D. The spinal transmission of nociceptive information: modulation by the caudal medulla. Neuroscience, 1995, 69, 31-938,

48. BOUHASSIRA D., VILLANEUVA L., LE BARS D. Effects of systemic morphine on diffuse noxious inhibitory controls:role of the periaqueductal gray. Eur. J. Pharmacol., 1992b, 216,149-156.

49. BOUHASSIRA D., VILLANEUVA L., LE BARS D. Intracerebroventricular morphine decreases descending inhibitions acting on lumbar dorsal horn neuronal activities, related to the pain in the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1988, 247, 332-342.

50. BOWERY N.G., SMART T.G. GABA and glycin as neurotransmitters: a brief history: a brief history Br. J. Pharmacol., 2006, 147(suppl.1) S 109-119.

51. BOYANOV A.I., T.I. PAJPANOVA, R.P. MUTAFCHIEVA, G.K. ROSTOV, B.G. TENCHOV, E.V. GOLOVINSKY. Effects of Structural Analogues of Enkephalin on the Thermotropic Behavior of Model Lipid Membranes. In: „Peptides 2004", Flegel, M. et al., eds., Kenes International, Geneva, 2005, 922-923.

52. BRAKADANSKA T, PAJPANOVA, T, A. BOCHEVA, V. PETKOV, E. GOLOVINSKY. Effects of some non-proteinogenic amino acids on nociception. Bulg. Chem.Commun., 2001, 33(1): 79-82.

53. BREDT D.S., S.H. SNYDER. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 682.

54. BREDT D.S., S.H. SNYDER. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. Neuron, 1992, 8, 3.

55. BUTLER R.K., REA K., LANG Y., GAVIN A.M., Finn D. Endocabanoid- mediated enhancement of fear-conditioned analgesia in rats: opioid receptor dependency and molecular correlates, Pain 140, 2008, 491-500.

56. CALZÀ L., GIARDINO L., CECCATELLI S. NOS mRNA in the paraventricular nucleus of young and old rats after immobilization stress. Neuro Report, 1993; 4:627–630.

57. Carvajal N., Kessi E., Bidart J. et. al., Properties of arginase from the foot muscle of Chiton latus. Comp. Biochem. Physiol., 1988, B 90, 385-388.

58. CESSELIN F. Opioid and anti-opioid peptides. Fundam Clin Pharmacol 1995, 9: 409-433.

59. CHAN W., WANG M., KOPPLE J.D., SWENDSEID E.M. Citrulline levels and urea cycle enzymes in uremic rats. J. Nutr., 1974, 104:678-683.

60. CHEN A.C., BROMM R.D. Tonic pain inhibits physic pain: evoked cerebral potention correlates in man. Psychiatry Res., 1985, 14.343-351.

61. CHEN C.C., WANG S.S., LEE F.Y. ET. AL. Proinflammatory cytokines in early assessment of the prognosis of acute pancreatitis. Am. J. Gastroenterol., 1999, 94: 213-218

62. CHEN C.C., WANG S.S., TSAY S.H. ET. AL. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on retrograde bile salt-induced pancreatitis rats. J Chin Med Assoc, 2004, 67: 9-14.

63. CHISHTY M., BEGLEY D.J., ABBOTT N.S. ET. AL. Interaction of nucleoside analogues with nucleoside transporters in rat brain endothelial cells. J. Drug Target., 2004, 12, 265-272.

64. CHO C.W., LIU Y., COBB W.N. ET. AL. Ultrasound-induced mild hyperthermia as a novel approach to increase drug uptake in brain microvessel endothelial cells. Pharm. Res. 2002, 19, 1123-1129.

65. CHUNG E, DAY E, BIEBER A, OHGAMI Y, QUOCK RM. Differential antinociceptive effects of L-arginine and 3-morpholinosydoimine. Proc West Pharmacol Soc., 2003; 46:78-9.

66. COENEN D., VERSCHUEREN P., WESTHOVENS R. ET AL., Technical and Diagnostic Performance of 6 Assays for the Measurement of Citrullinated Protein/Peptide Antibodies in the Diagnosis of Rheumatoid Arthritis, Clin. Chem., 2007, 53(3): 498-504.

67. CONTET, C, GAVERIAUX-RUFF, C, MATIFAS, A., CARADEC, C., CHAMPY M.F. Dissociation of analgesic and hormonal responces to forced swim stress, using opioid receptor nock-out mice. Neuropsychopharmacology, 2006, 31, 1733-1744.

68. COSTA A., TRAINER P., BESSER M., GROSSMAN A. Nitric oxide modulates the release of corticotropin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro. Brain Res., 1993; 605:187–192.

69. COX M., LEHNINGER A.L., NELSON D.K. Lehninger principles of biochemistry (3rd ed.) New York: Worth Publishers., 2000, 153-6.

70. COX, J., WESTBROOK, R.F. The NDMA receptor antagonist MK-801 blocks acquisition and extinction of conditioned hypoalgesic responces in the rat. Q. J. Exp. Psychol., 1994, 47, 187-210.

71. CROSBY G, MAROTA JJ, HUANG PL. Intact nociception-induced neuroplasticity in transgenic mice deficient in neuronal nitric oxide synthase, Neuroscience, 1995; 69:1013–1017.

72. CULLINAN WE, HERMAN JP, HELMREICH DL, WATSON SJ. The neuroanatomy of stress. In: Neurobiological and Clinical Consequences of Stress: From Normal Adaptation to PTSD, 1995.

73. CUNNINGHAM P.M., GOLDSMITH G.E., HELLON R.F. Medial hypothalamic stimulation producing analgesia to facial heating in unrestrained rats. Neurosci. Lett. 1986, 68, 107-11.

74. DAHLMAN D.L., ROSENTHAL G.A. Non-protein amino acid-insect interactions. I. Growth effects and symptomology of L-canavanine consumption by tobacco hornworm, Manduca sexta (L.) Comp. Biochem. Physiol., 1975, 33-36

75. DALLMAN MF, BHATNAGAR S, VIAU V. Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis, Encyclopedia of Stress. Academic Press, 2000; 2: 468-476.

76. DALLMAN MF. Stress update: adaptations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress. Trends Endocrinol. Metab., 1993; 4:62-69.

77. DE FELIPE C, HERRERO JF, O'BRIEN JA, PALMER JA, DOYLE CA, SMITH AJ, LAIRD JM, BELMONTE C, CERVERO F, HUNT SP. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. Nature, 1998;392(6674):394-7.

78. DE KLOET ER, JOËLS M, HOLSBOER F. Stress and the brain: from adaptation to disease. Nat Rev Neurosci., 2005; 6(6):463-75.

79. DE KLOET ER. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. Front Neuroendocrinol., 1991; 12:95–164.

80. DE KLOET ER. Hormones, brain and stress. Endocr Regul. 2003; 37(2):51-68.

81. DENNIS S.G., CHOINIERE M., MELZACK R. Stimulation-produced analgesia in rats: assessement by 2 pain tests and correlation with self-stimulation. Exp. Neurol., 1980, 68,295-309.

82. DEYAMA S., YAMAMOTO J, MACHIDA T., TANIMOTO S., NAKAGAWA T., KANEKO S., SATOH M., MINAMI M. Inhibition of glutamatergic transmission by morphine in the basolateral amygdaloid nucleus reduces pain-induced aversion. Neurosci. Res, 2007, 59,199-204.

83. DIXIT C, RASTOGI L, DIKSHIT M. Effect of nitric oxide modulators on pylorus-ligation-induced ulcers in the rat. Pharmacol Res., 1999, 39(1):33-9.

84. DJORDJEVIC J, CVIJIC G, DAVIDOVIC V. Different activation of ACTH and corticosterone release in response to various stressors in rats. Physiol Res. 2003, 52(l): 67-72.

85. DJORDJEVIC J, VUCKOVIC T, JASNIC N, CVIJIC G. Effect of various stressors on the blood ACTH and corticosterone concentration in normotensive Wistar and spontaneously hypertensive Wistar-Kyoto rats. Gen Comp Endocrinol, 2007, 153, 1-3, 217-20.

86. DUFTOM L.M., KONIK B., COLLETI R., STANGER C., BOYER M., MORROW S., COMPAS B.E. Effects of stress on on pain threshold and tolerance in children with recurrent abdominal pain. Pain, 2008; 136(1-2):38-43.

87. ERCHEGUI J., A.J. KASTIN, J.E. ZADINA. Isolation of a novel tetrapeptide with opiate and antiopiate activity from human cortex:Tyr-Pro-Trp-Gly-NH_2 (Tyr-W-MIF-1). Peptides, 1992, 13:623-631.

88. ERCHEGUI J., J.E. ZADINA, X.D. QUI. Structure-activity relationship of analogs of the endogenous brain peptides Tyr-MIF-1 and Tyr-W-MIF-1. Peptide Res., 1993, 6:31-38.

89. ESCH T, STEFANO GB, FRICCHIONE GL, BENSON H. Stress-related diseases - a potential role for nitric oxide. Med Sci Monit., 2002, 8(6):103-18.

90. FANSELOW M.S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. Behav. Brain Res., 110, 2000, 73-81.

91. FAVARONI MENDES LA, MENESCAL-DE-OLIVEIRA L. Role of cholinergic, opioidergic and GABAergic neurotransmission of the dorsal hippocampus in the modulation of nociception in guinea pigs. Life Sci., 2008; 83(19-20):644-50.

92. FEATHERSTON W.R., ROGERS Q.R., FREEDLAND R.A. Relative importance of kidney and liver in synthesis of arginine by the rat. Amer. J. Physiol., 1973, 224, 127-129.

93. FIEBE A., KOESLING D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. Circ. Res., 93, 2003, 96-105.

94. FILARETOV A.A., BOGDANOV A.I., IARUSHKINA N.I. Stress-induced analgesia. The role of hormones of the hypopphyseal-adrenocortical system. Neurosci. Behav. Physiol., 1996, 26, 572-578.

95. FINN D.P., BECKETT S.R., RICHARDSON D., KENDALL D.A., MARSDEN C.A., CHAPMAN V. Evidence for differential modulation of conditioned aversion and fear-conditioned analgesia by CB1 receptors. Eur J Neurosci., 2004, 20, 848-852.

96. FINN D.P., JHAVERI M.D., BECKETT S.R., MADJD A., KENDALL D.A., MARSDEN C.A., CHAPMANV. Behavioral, central monoaminergic and hypothalamo- pituitary-adrenal axis correlates of fear-conditioned analgesia in rats. Neuroscience, 2006, 138, 1309-1317.

97. FOO H., HELMSTETTER F.J. Expression of antinociception in response to a signal for shock is blocked after selective down-regulation of mu-opioid receptorsin the rostral ventromedial medulla. Brain Res. Mol. Brain Res., 2000, 76, 282-288.

98. FORD G.K., FINN, D.P. Clinical correlates of stress-induced analgesia: evidence from pharmacological studies. Pain, 2008, 140, 3-7.

99. FORD GK, MORIARTY O, MCGUIRE BE, FINN DP. Investigating the effects of distracting stimuli on nociceptive behaviour and associated alterations in brain monoamines in rats. Eur J Pain., 2008;12(8):970-9.

100. FÖRSTERMANN U., BOISSEL J.P., KLEINERT H. Expressional control of the "constitutive" isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III), Faseb J., 1998, 19(10) 773-90.

101. FUCHS P.N., BALINSKI M., MELZACK R. Electrical stimulation of the cingulum bundle and surrounding cortical tissue reduces formalin-test pain in the rat. Brain Res., 1996a, 743,116-123,

102. FUCHS P.N., MELZACK R. Restraint reduces formalin-test pain, but the effect is not influenced by lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. Exp. Neur., 1996, 139,299-305.

103. FUKUDA T., NISHIMOTO C., MIYABE M., TOYOOKA H. Unilateral adrenalectomy attenuates haemorrhagic shock-induced analgesia in rats. J. Anesth., 2001, 21,348-353.

104. FUNG S.C., FILLENZ M. The role of pre-synaptic GABA and benzodiazepine receptors in the control of noradrenaline release in rat hippocampus. Neurosci. Lett., 1983,42,61-66.

105. GABATHULER R. Blood-brain barrier transport of drugs for the treatment of brain diseases. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2009;8(3):195-204.

106. GALINA ZH, KASTIN AJ. Tyr-MIF-1 attenuates antinociceptive responses induced by three models of stress-analgesia. Br J Pharmacol. 1987, 90(4):669-74.

107. GARTHWAITE J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. Trends Neurosci. 1991, 14(2):60-7.

108. GILBERT A. K., FRANKLIN K.B. The role of descending fibers from the rostral ventromedial medulla in opioid analgesia in rats. Eur.J. Pharmacol., 2002, 449, 75-84.

109. GILINSKII MA, PETRAKOVA GM, AMSTISLAVSKAYA TG, MASLOVA LN, BULYGINA VV. Hypothalamic monoamines in cold stress on the background of changes in the activity of the nitric oxide system. Neurosci Behav Physiol., 2005; 35(2):171-5.

110. GILLESPIE JS, LIU X, MARTIN W. The neurotransmitter of the non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves to smooth muscle of the genital system. In Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System, ed. by S. Moncada and E. A. Higgs 147-164, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1990.

111. GOLDSTEIN DS, PACAK K, KOPIN IJ. Nonspecificity versus primitive specificity of stress response. In: Stress: Molecular Genetic and Neurobiological Advances. Mccarthy R., Aguilera G, Sabban E, Kvetnansky R (eds), Gordon and Breach, New York, 1996; 3-20.

112. GOTTI S, SICA M, VIGLIETTI-PANZICA C, PANZICA G. Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. Microsc Res Tech., 2005; 68(1):13-35.

113. GREEN M.H., WARD J.F. Enhancement of human tumor cell killing by L-Canavanine in combination with γ-radiation, Cancer Res., 1983, 43-4180-4182.

114. GREENWELL T.N., MARTIN-SCHIELD S., INGILIS F.M, ZADINA J.E. Colocalization and shared distribution of endomorphins with substance P, calcitonin gene-related peptide, gama-aminobutirique acid, and the mu opioid receptor. J. Comp. Neurol., 2007, 10:503(2): 319-33.

115. GUI X., CARAWAY R.E., DOBNER P.R. Endogenous neurotensin facilitates visceral nociception and is required for stress-induced antinociception in rats and mice. Neuroscience, 2004, 126, 1023-1032.

116. GUPTA V, GUPTA A, SAGGU S, DIVEKAR HM, GROVER SK, KUMAR R. Anti-stress and Adaptogenic Activity of l-Arginine Supplementation. Evid Based Complement Alternat Med. 2005; 2(1):93-97.

117. GUZMAN M.H., ROSADO A.E., KRUSE J.A. Vasopressin vs. norepinephrine in endotoxic shock: systemic, renal, and splanchnic hemodynamic and oxygen transport effects, J. Appl. Physiol, 2003, 95: 803-809.

118. HACKLER L., CAREY M.E., KASTIN A.J. Enhanced isolation of Tyr-MIF-1 from fresh human brain cortex, Brain. Res. Bull., 1995, 36:109-11.

119. HARIMA A., H. SHIMIZU AND H. TAKAGI, Analgesic effect of L-arginine in patients with persistent pain. Eur. Neuropsychopharmacol., 1991, 1, 529.

120. HARRIS, J. A., WESTBROOK, R. F. Midazolam impairs the acquisition of conditioned analgesia if rats are tested with an acute but not a chronic noxious stimulus. Brain Res Bull., 1996, 39, 227-233.

121. HARRIS, J. A., WESTBROOK, R. F., DUFFIELD, T. Q. AND BENTIVOGLIO, M. Fos expression in the spinal cord is suppressed in rats displaying conditioned hypoalgesia. Behav Neurosci., 1995,109, 320-328.

122. HATAKEYAMA S, KAWAI Y, UEYAMA T, SENBA E. Nitric oxide synthase-containing magnocellular neurons of the rat hypothalamus synthesize oxytocin and vasopressin and express Fos following stress stimuli. J Chem Neuroanat., 1996; 11(4):243-56.

123. HĂULICĂ I, BUSUIOC A, NEAMŢU C, DORNEANU V, TITU G, SPAC A. Possible involvement of L-arginine-nitric oxide pathway in the modulation of stress-induced analgesia. Rom J Physiol., 1997; 34(1-4):19-24.

124. HĂULICĂ I., NEAMTU C., STRATONE A., PETRESCU G., BRANISTEANU D., ROSCA V., SLATINEANU S. Evidence for the involvement of cerebral renin-angiotensin system (RAS) in stress analgesia. 1986, Pain, 27, 237-245.

125. HAYASHI T, JULIET PA, MATSUI-HIRAI H, MIYAZAKI A, FUKATSU A, FUNAMI J, IGUCHI A, IGNARRO LJ. L-citrulline and L-arginine supplementation retards the progression of high-cholesterol-diet-induced atherosclerosis in rabbits. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 20;102(38):13681-6.

126. HELMSTETTER F. J. The amygdala is essential for the expression of conditional hypoalgesia. Behav Neurosci., 1992, 106, 518-528.

127. HELMSTETTER F. J., LANDEIRA-FERNANDEZ J. Conditional hypoalgesia is attenuated by naltrexone applied to the periaqueductal gray. Brain Res, 1990, 537, 88-92.

128. HELMSTETTER F.J., BELLGOWAN P. S., TERSHNER S.A. Inhibition of the tail flick reflex following microinjection of morphine into the amygdala. Neuroreport, 1993, 4, 471- 474.

129. HOBIN J.A., JI J., MAREN S. Ventral hippocampal muscimol disrupts contextspecific fear memory retrieval after extinction in rats. Hippocampus, 2006, 16, 174-182.

130. HOLMES MC, ANTONI FA, AGUILERA G, CATT KJ. Magnocellular axons in passage through the median eminence release vasopressin. Nature, 1986, 319:126–9.

131. HOMAYOUN H, KHAVANDGAR S, DEHPOUR AR. The involvement of endogenous opioids and nitricoxidergic pathway in the anticonvulsant effects of foot-shock stress in mice. Epilepsy Res., 2002; 49(2):131-42.

132. HONSOVA E., LODERÉROVA A., BALAZ P., ET. AL. Plasma citrulline levels and acute cellular rejection early after small bowel transplantation in pigs. Veterinarni Medicina, 2009, 54(5): 215–222.

133. HORI N, LEE MC, SASAGURI K, ISHII H, KAMEI M, KIMOTO K, TOYODA M, SATO S. Suppression of stress-induced nNOS expression in the rat hypothalamus by biting. J Dent Res., 2005; 84(7):624-8.

134. HORVATH A, KASTIN AJ. Isolation of tyrosine-melanocyte-stimulating hormone release-inhibiting factor 1 from bovine brain tissue. J Biol Chem., 1989;264(4):2175-9.

135. HORVATH A., A.J. KASTIN. Evidence for presence of Tyr-MIF-1 (Tyr-Pro-Leu-Gly-NH_2) in human brain cortex. Int. Protein Res. 1990, 36: 281-284.

136. HOUSTON A.J., WONG J.C., EBENEZER I.S. A study on the involvement of GABA-B receptor ligands in stress-induced antinociception in male mice. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1997. 19, 167-171.

137. HUA S., HERMANUSSEN S., TANG L., MONTEITH G. R., CABOT P.J. The neuralcell adhesion molecule antibody blocks cold water swim stress-induced analgesiaand cell adhesion between lymphocytes and cultured dorsal root ganglionneurons. Anesthesia and analgesia, 2006, 103, 1558-1564.

138. HUGUES S., DESCHAUX O., GARCIA R. Postextinction infusion of a mitogenactivatedprotein kinase inhibitor into the medial prefrontal cortex impairsmemory of the extinction of conditioned fear. Learn Mem., 2004, 11, 540-543.

139. HYNYNEN K., MCDANNOLD N., SHEIKOV N.A. ET. AL.. Local and reversible blood-brain barrier disruption by noninvasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications. Neuroimage 2005, 24,12-20.

140. HYNYNEN K., MCDANNOLD N., VYKHODTSEVA N. ET. AL. Non-invasive opening of BBB by focused ultrasound. Acta Neurochir. Suppl., 2003, 86: 555-558.

141. INOUE M, RASSHID MH, KAWASHIMA T, ET AL. The algogenic-induced nociceptive flexion test in mice: studies on sensitivity of the test and stress on animals. Brain Res Bull., 2003; 60: 275-281.

142. JENKINSON C.P., GRODY W.W., CEDERBAUM S.D. Comparative properties of arginases. Comp. Biochem. Physiol., 1996, B 114, 107-132

143. JIA H., XIE Y.F., XIAO D.Q. Tang, J.S. Involvement of GABAergic modulationof the nucleus submedius (Sm) morphine-induced antinociception. Pain, 2004, 108, 28-35.

144. JOHNSON EO, KAMILARIS TC, CHROUSOS GP, GOLD PW. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. Neurosci Biobehav Rev., 1992; 16(2):115-30.

145. KASTIN AJ, BANKS WA, HAHN K., JE ZADINA. Extreme stability of Tyr-MIF-1 in CSF. Neurosci. Lett. 1994, 174:26-28.

146. KASTIN AJ, MB FASOLD, JE ZADINA. Short Communication - endomorphins, Met-enkephalin, Tyr-MIF-1, and P-Glycoprotein efflux system. Drug metabolism and disposition. 2002, 30: 231-234.

147. KAVALIERS M, COLWELL DD. Sex differences in opioid and non-opioid mediated predator-induced analgesia in mice. Brain Res., 1991; 568:173–177.

148. KAVALIERS M, INNES D. Stress-induced opioid analgesia and activity in deer mice: sex and population differences. Brain Res., 1987; 425:49–56.

149. KAVALIERS M. Evidence for opioid and non-opioid forms of stress-induced analgesia in the snail, Cepaea nemoralis. Brain Res. 1987, 410(1):111-5.

150. KAVALIERS M. Evolutionary and comparative aspects of nociception. Brain Res Bull., 1988; 21: 923–931.

151. KAVALIERS M. Responsiveness of deer mice to a predator, the short-tailed weasel: population differences and neuromodulatory mechanisms. Physiol Zool., 1990; 63:338–407.

152. KAWABATA A, S. MANABE, H. TAKAGI. Comparison of antinociception induced bysupraspinally administered L-arginine and kyotorphin. Br. J. Pharmacol., 1994a, 112, p. 817.

153. KAWABATA A, TANAKA M, MUGURUMA H, Takagi H. N^G-nitro-L-arginine methyl ester and alpha-methyl-L-ornithine inhibit kyotorphin synthetase from rat brain. Peptides, 1995; 16(7):1317-9.

154. KAWABATA A, UEDA N, H. TAKAGI. L-arginine exerts a dual role in nociceptive processing in the brain: involvement of the kyotorphin-Met-enkephalin pathway and NO-cyclic GMP pathway. Br J Pharmacol., 1993; 109(1):73-9.

155. KAWABATA A.S., Y. MANABE, H. TAKAGI. Effect of topical administration of L-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. Br J Pharmacol., 1994b; 112(2):547-50.

156. KAWABATA, A., Y. FUKUZUMI, Y. FUKUSHIMA, H. TAKAGI. Antinociceptive effect of L-arginine on carrageenin-induced hyperalgesia in rats:possible involvement of central opioid-ergic systems. Eur. J. Pharmacol., 1992, 218, 153.

157. KAYSEN GA, STRECKER HJ. Purification and properties of arginase of rat kidney. Biochem J. 1973, 133, 779-788.

158. KELSEY, J. E., HOERMAN, W. A. T., KIMBALL, L. D., 3RD, RADACK, L. S. AND CARTER, M. V. Arcuate nucleus lesions reduce opioid stress-induced analgesia (SIA) andenhance non-opioid SIA in rats. Brain Res, 1986, 382, 278-290.

159. KEST B, JENAB S, BRODSKY M, SADOWSKI B, BELKNAP JK, MOGIL JS, INTURRISI CE. Mu and delta opioid receptor analgesia, binding density, and mRNA levels in mice selectively bred for high and low analgesia. Brain Res. 1999;816(2):381-9.

160. KIEFFER, B. L. Opioids: first lessons from knockout mice. Trends Pharmacol Sci 1999, 20, 19-26.

161. KILLIAN, P., HOLMES, B. B., TAKEMORI, A. E., PORTOGHESE, P. S. AND FUJIMOTO, J. M. Cold water swim stress- and delta-2 opioid-induced analgesia are modulated by spinal gamma-aminobutyric acidA receptors. J Pharmacol Exp Ther, 1995, 274, 730-734.

162. KIM CH, OH Y, CHUNG JM, CHUNG K. Changes in three subtypes of tetrodotoxin sensitive sodium channel expression in the axotomized dorsal root ganglion in the rat. Neurosci Lett., 2002; 323(2):125-8.

163. KIM, J.J., YOON KS. Stress: metaplastic effects in the hippocampus. Trends Neurosci., 1998; 21(12):505-9.

164. KISHIMOTO J, TSUCHIYA T, EMSON PC, NAKAYAMA Y. Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. Brain Res., 1996; 720(1-2):159-71.

165. KIYATKIN EA. Nociceptive sensitivity/behavioral reactivity regulation during aversive states of different nature: its mediation by opioid peptides. Int J Neurosci 1989, 44: 91-110.

166. KNAPSKA E, MACIAS M, MIKOSZ M, NOWAK A, OWCZAREK D, WAWRZYNIAK M, PIEPRZYK M, CYMERMAN IA, WERKA T, SHENG M, MAREN S, JAWORSKI J, KACZMAREK L. Functional anatomy of neural circuits regulating fear and extinction. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(42):17093-8.

167. KNAPSKA E, MAREN S. Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. Learn Mem. 2009;16(8):486-93.

168. KNOWLES R.G., MONCADA S. Nitric oxid synthases in mammals. Biochem J, 1994, 298-258.

169. KNOWLES RG, PALACIOS M, PALMER RM, MONCADA S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. Proc Natl Acad Sci USA, 1989;86(13):5159-62.

170. KOKO V, DJORDJEVIAE J, CVIJIAE G, DAVIDOVIAE V. Effect of acute heat stress on rat adrenal glands: a morphological and stereological study. J Exp Biol., 2004, 207(Pt24):4225-30.

171. KRUKOFF TL, KHALILI P. Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain. J Comp Neurol., 1997; 377(4):509-19.

172. KRUSE P.K, MCCOY T.A. The Competitive Effect of Canavanine on Utilization of Arginine in Growth of Walker Carcinosarcoma 256 Cells in Vitro. Cancer Res., 1958, 18:279-282.

173. KULLING P., FRISCHKNECHT H.R., PASI A., WASER P.G., SIEGFRIED B. (Socialconflict-induced changes in nociception and beta-endorphin-likeimmunoreactivity in pituitary and discrete brain areas of C57BL/6 and DBA/2mice. Brain Res, 1988, 450, 237-246.

174. KUMAR A., THOTA V., DEE L., OLSON J, URETZ E, PARRILLO JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. J Exp Med, 1996, 183:949-956.

175. LAPO I.B., KONARZEWSKI M., SADOWSKI B. Effect of cold acclimation and repeated swimming on opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia in selectively bred mice. Physiol Behav., 2003, 78, 345-350.

176. LAVULO L.T., SOSSONG T.M., BRIGHAM-BURKE M.R., DOYLE ML, COX JD, CHRISTIANSON DW, ASH DE. Subunit-subunit interaction in trimeric arginase. Generation of active monomers by mutation of single amino acid. J. Biol. Chem., 2001, 276, 14 242-14248

177. LEE R.P., WANG D., KAO S.J., CHEN H. The lung is the major site that produces nitric oxide to induce acute pulmonary oedema in endotoxin shock. Clin Exp Pharmacol Physiol., 2001, 28: 315-320.

178. Lerieche M., Mendez M., Ethanol exposure selectively alters beta-endorphin content but not 3H-DAMGO binding in discret regions of the rat brain, Neuropeptides, 2010, 44(1):p.9-16.

179. LESTER LS, FANSELOW MS. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. Behav Neurosci., 1985; 99:756–759.

180. LEVY B.,VALLECH.,LAUZIERF.ET.AL. Comparative effects of vasopressin, norepinephrine, and L-canavanine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in endotoxic shock. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004, 287, H209-H215.

181. LEWIS JW, CANNON JT, LIEBESKIND JC. Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia. Science. 1980;208(4444):623-5.

182. Lico, M. C., Hoffmann, A. and Covian, M. R. Influence of some limbic structuresupon somatic and autonomic manifestations of pain. Physiol Behav, 1974, 12, 805-811.

183. LOPEZ, R., YOUNG, S. L., COX, V. C. Analgesia for formalin-induced pain bylateral hypothalamic stimulation. Brain Res, 1991, 563, 1-6.

184. LOVALLO W.R. The hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in addiction, Int. J. Psychophysiol., 2006, 59(3), 193-194.

185. MADDEN J, AKIL H, PATRICK RL, BARCHAS JD. Stress-induced parallel changes in central opioid levels and pain responsiveness in the rat. Nature Land, 1977; 256:358-360.

186. MANSART A, BOLLAERT PE, GIUMMELLY P, CAPDEVILLE-ATKINSON C, ATKINSON J. Effects of dexamethasone and L-canavanine on the intracellular calcium-contraction relation of the rat tail artery during septic shock. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 Sep;291(3):H1177-82.

187. MANTEGAZZA P, TAMMISO R, VICENTINI L, ZAMBOTTI F, ZONTA N. Muscimol antagonism of morphine analgesia in rats. Br J Pharmacol. 1979;67(1):103-7.

188. MAO J. NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. Brain Res Rev., 1999; 30:289–304.

189. MAREK P, PANOCKA I, SADOWSKI B. Involvement of humoral factors in the mechanism of stress-induced analgesia in mice. Ann N Y Acad Sci., 1986;467:361-70.

190. MARTÍ O, GAVALDÀ A, GÓMEZ F, ARMARIO A. Direct evidence for chronic stress-induced facilitation of the adrenocorticotropin response to a novel stressor. Neuroendocrinology, 1994; 60:1-7.

191. MARTIN R, VOIGT KH. Enkephalins co-exist with oxytocin and vasopressin in nerve terminals of rat neurohypophysis. Nature, 1981; 289(5797):502-4.

192. MASOOD A, BANERJI B, VIJAYAN VK, RAY A. Pharmacological and biochemical studies on the possible role of nitric oxide in stress adaptation in rats. Eur J Pharmacol., 2004; 493(1-3):111-5.

193. MAYER, D. J., MAO J, HOLT J, PRICE, D. D. Cellular interactions of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1999; 96:7731–7736.

194. MAYER, D. J., PRICE, D. D. Central nervous system mechanisms of analgesia.Pain, 1976, 2, 379-404.

195. MCCANN S.M. The Anterior Pituitary and Hpothalamus. In: Griffin, J.D., Ojeda, S.R. (Eds.), Textbook of Endocrine Physiology. Oxford University Press, New York, Oxford, 1988; 70-99.

196. MCEWEN BS. Protective and damaging effects of stress mediators. N Engl J Med., 1998; 338:171–179.

197. MCEWEN BS. Stress, brain, and behavior: life-long effects upon health and disease. In: Kinney JM, Tucker HN, eds. Physiology, stress, and malnutrition. Functional correlates of nutritional intervention. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997; 113–130.

198. MCLEOD TM, LÓPEZ-FIGUEROA AL, LÓPEZ-FIGUEROA MO. Nitric oxide, stress, and depression. Psychopharmacol Bull., 2001; 35(1):24-41.

199. MCNALLY GP, AKIL H. Effects of contextual or olfactory cues previously paired with morphine withdrawal on behavior and pain sensitivity in the rat. Psychopharmacology (Berl). 2001;156(4):381-7.

200. MEAGHER M.W., ARNAU R.C., RHUDY J.L. Pain and emotion: effects of affective picture modulation. Psychosom Med, 2001, 63, 79-90.

201. MEAGHER M.W., GRAU J.W., KING R.A. Role of supraspinal systems in environmentally induced antinociception: effect of spinalization and decerebration on brief shock-induced and long shock-induced antinociception. Behav Neurosci, 1990, 104, 328-338.

202. MELZACK R., WALL P. D. On the nature of cutaneous sensory mechanisms. Brain 1962, 85, 331-356.

203. MELZACK R., WALL P. D. Pain mechanisms: a new theory. Science, 1965, 150, 971-979.

204. MENA N.B., MATHUR R., NAYAR U. Amygdalar involvement in pain. Indian JPhysiol Pharmacol, 1995,39, 339-346.

205. MENENDEZ L, ANDRES-TRELLES F, HIDALGO A, BAAMONDE A. Involvement of spinal kappa opioid receptors in a type of footshock induced analgesia in mice. Brain Res. 1993;611(2):264-71.

206. MICZEK KA, THOMPSON ML, SHUSTER L. Opioid-like analgesia in defeated mice. Science, 1982; 215:1520–1522.

207. MILLAN M. J. Descending control of pain. Prog Neurobiol, 2002, 66, 355-474.

208. MILLAN M.J. The induction of pain: an integrative review. Prog Neurobiol, 1999,57,1-164.

209. MILLAN M.J. The neurobiology and control of anxious states. Prog Neurobiol, 2003, 70, 83-244.

210. MILLAN M.J., GRAMSCH C., PRZEWLOCKI R., HOLLT, HERZ A. Lesions of thehypothalamic arcuate nucleus produce a temporary hyperalgesia and attenuate stress-evoked analgesia. Life Sci, 1980a, 27, 1513-1523.

211. MILLAN M.J., PRZEWLOCKI R., HERZ A. A non-beta-endorphin-ergicadenohypophyseal mechanism is essential for an analgetic response to stress. Pain, 1980b, 8, 343-353.

212. MONCADA S. The L-arginine: nitric oxide pathway. Acta Physiol Scand., 1992; 145(3):201-27.

213. NAKAGAWASAI O., TADANO T., TAN NO K., NIIJIMA F., SAKURADA S., ENDO Y., KISARA K. Changes in beta-endorphin and stress-induced analgesia in mice afterexposure to forced walking stress. Methods and findings in experimental andclinical pharmacology 1999, 21, 471-476.

214. NAKANE M, SCHMIDT HH, POLLOCK JS, FÖRSTERMANN U, MURAD F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. FEBS Lett., 1993; 316:175-180.

215. NATHAN C, XIE QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J. Biol. Chem. 1994; 269:13725-13728,

216. NELSON RJ, KRIEGSFELD LJ, DAWSON VL, DAWSON TM. Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior. Front Neuroendocrinol., 1997; 18(4):463-91.

217. NOWAK A, WERKA T, KNAPSKA E. Social modulation in extinction of aversive memories. Behav Brain Res., 2013;238:200-5.

218. OKADA Y., FUJITA T., MOTOYAMA TSUDA Y, YOKOI T, LI T, SASAKI Y, AMBO A, JINSMAA Y, BRYANT SD, LAZARUS LH. Structural studies of (2,6-dimethyl-l-tyrosine) endomorphin-2-analogues enhanced activity and cis orientation of the Dmt-Proamide bond. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2003, 11(9), 1983-1994.

219. ONODERA K., SAKURADA S., FURUTA S., YONEZAWA A., HAYASHI T., HONMA I., MIYAZAKI S. Age-related differences in forced walking stress-inducedanalgesia in mice. Drugs Exp Clin Res, 2001, 27, 193-198.

220. PACÁK K, PALKOVITS M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. Endocr Rev., 2001; 22:502-548.

221. PAN W, KASTIN AJ. From MIF-1 to endomorphin: The Tyr-MIF-1 family of peptides. Peptides, 2007, 28(12):2411-2434.

222. PANOCKA I., MAREK P., SADOWSKI B. Tolerance and cross-tolerance withmorphine in mice selectively bred for high and low stress-induced analgesia.Pharmacol Biochem Behav, 1991, 40, 283-286.

223. PANOCKA I., SADOWSKI B., MAREK P. Adrenalectomy and dexamethasone-differentially affect postswim antinociception in mice selectively bred for highand low stress-induced analgesia. Physiol Behav., 1987,40, 597-601.

224. PAROLARO D., MASSI P., PATRINI G., RUBINO T., PARENTI M., GORI E. Pertussistoxin pretreatment affects opiate/nonopiate and stress-induced analgesiadifferently. Pharmacol Biochem Behav, 1991, 38, 569-573.

225. PEÑALVA RG, FLACHSKAMM C, ZIMMERMANN S, WURST W, HOLSBOER F, REUL JM, LINTHORST AC. Corticotropin-releasing hormone receptor type 1-deficiency enhances hippocampal serotonergic neurotransmission: an in vivo microdialysis study in mutant mice. Neuroscience, 2002; 109(2):253-66.

226. PESCHANSKI M., MANTYH P.W. Efferent connections of the subfascicular areaof the mesodiencephalic junction and its possible involvement in stimulation produced analgesia. Brain Res, 1083, 263, 181-190.

227. PETERSEN Y.M., BJORKENBERG, DERIKX J. ET. AL.. Abs. pres. at. "The Mucositis Research Workshop" at the International Symposium on Supportive care in Cancer (MASCC). Huston, Texas June 2008, 26-28.

228. POLT R, PORRECA F, SZABÒ LZ, Bilsky EJ, Davis P, Abbruscato TJ, Davis TP, Harvath R, Yamamura HI, Hruby VJ. Glycopeptide enkephalin analogues produce analgesia in mice: evidence for penetration of the blood-brain barrier. Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91(15):7114-8.

229. POLT R., SZABO L., TREIBERG J., LI Y., HRUBY V. J. General methods for alpha- or beta-O-Ser/Thr glycosides and glycopeptides. Solid-phase synthesis of O-glycosyl cyclic enkephalin analogs. J. Am. Chem. Soc., 1992, 114 (26), 10249–10258.

230. PORTUGAL T., ASKNES A. Arginase activity in different fish species and tissues. Comp. Biochem. Physiol., 1983, B 76, 15-16.

231. PUGLISI-ALLEGRA, S., CASTELLANO, C. AND OLIVERIO, A. Circadian variations in stressinduced analgesia. Brain Res ,1982,252, 373-376.

232. RAND MJ. Nitrergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergicneuro-effectortransmission.ClinExpPharmacol. Physiol.,1992,19:147-169.

233. RANDALL LO, SELITTO JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch Int Pharmacodyn Ther., 1957; 111(4):409-19.

234. RAPPOPORT S.I. Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. Cell Mol Neurobiol, 2000, 20, 217-230

235. RHODES DL, LIEBESKIND JC. Analgesia from rostral brain stem stimulation in the rat. Brain Res. 1978;143(3):521-32.

236. Riedel W, NEECK G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. Z Rheumatol., 2001; 60(6):404-15.

237. RIEDEL W. Role of nitric oxide in the control of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. Z Rheumatol., 2000; 59 Suppl 2:II/36-42.

238. RIMANDO, A.M., PERKINS VEAZIE, P.M. Determination of citrulline in watermelon rind. Journal of Chromatography A, 2005, 196–200.

239. ROSECRANS JA, ROBINSON SE, JOHNSON JH, MOKLER DJ, HONG JS. Neuroendocrine, biogenic amine and behavioral responsiveness to a repeated foot-shock-induced analgesia (FSIA) stressor in Sprague-Dawley (CD) and Fischer-344 (CDF) rats. Brain Res. 1986;382(1):71-80.

240. ROSENTHAL G.A. Investigation of canavanine biochemistry in the jack bean plant, Canavalia ensiformia (L.) DC. II. Canavanine biosynthesis in the developing plant. Plant Physiol. 1972, 50: 328-331.

241. ROSENTHAL G.A. The preparation and colometric analysis of L-canaline. Anal. Biochem. 1973, 51:354-361.

242. ROSENTHAL, G. A., REICHHART, J.M. AND HOFFMANN J.A. L-canavanine incorporation into vitellogenin and macromolecular conformation. J. Biol. Chem. 1989, 264: 13 693- 13 696.

243. ROSENTHAL, G.A. GULATI D.K. AND SABHARWAL P. Studies on the growth effects of the Canaline-urea cycle amino acids with Lemna minor L. Plant Physiol,1975, 56, 420-424.

244. ROSENTHAL, G.A.. The biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine. Q. Rev. Biol. 1977, 52, 155-178.

245. SCHERER-SINGLER U, VINCENT SR, KIMURA H, MCGEER EG. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. J Neurosci Methods, 1983; 9(3):229-34.

246. SESSA WC. The nitric oxide synthase family of proteins. J Vasc Res., 1994; 31:131-143.

247. SETA, K. A., JANSEN, H. T., KREITEL, K. D., LEHMAN, M., BEHBEHANI, M. M. Cold water swim stress increases the expression of neurotensin mRNA in the lateral hypothalamus and medial preoptic regions of the rat brain. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 86, 145-152.

248. SHIRAKAWA T, MITOME M, KIKUIRI T, NAKAMURA W, OSHIMA S, HASEGAWA T, SHINDOH M, OGUCHI H. Immobilization induces acute nitric oxide production in the rat hypothalamus: a role of ionotropic glutamate receptors in the paraventricular nucleus. Endocrinology, 2004; 145(8):3603-7

249. SILVERMAN M.B., HERMES S.M., ZADINA J.E., AICHER S.A. Mu-opioid receptor is present in dendritic targets of endomorphin-2 axon terminals in the nuclei of the solitary tract, Neuroscience, 2005, 135:887-896.

250. SINHA RK. Study of changes in some pathophysiological stress markers in different age groups of an animal model of acute and chronic heat stress. Iran Biomed J. 2007, 11(2): 101-11.

251. SLOMINSKI A.T., ZMIJEWSKI M.A., ZBYTEK B. Regulated proenkephalin expression in human skin and cultured skin cells. J Invest Dermatol, 2011, 131, 613-622.

252. SNOW A. E., TUCKER S. M., DEWEY W. L. The role of neurotransmitters instress-induced antinociception (SIA). Pharmacol Biochem Behav, 1982, 16, 47-50.

253. SNYDER SH, BREDT DS. Biological roles of nitric oxide. Sci Am., 1992; 266(5):68-71, 74-7.

254. SUN XC, LI WB, LI SQ, LI QJ, CHEN XL, AI J. Intrathecal injection of Sar9, Met(O2)11-substance P, neurokinin-1 receptor agonist, increases nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in the rat spinal cord. Sheng Li Xue Bao, 2003; 55(6):677-83.

255. Sutherland R.J., O'Brien J., Lehmann H. Absence of systems consolidation of fear memories after dorsal, ventral, or complete hippocampal damage. Hippocampus 2008, 18, 710-718.

256. SUZUKI N., SAKAMOTO A., OGAWA R. Effect of L-canavanine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on Myocardial dysfunction during septic shock. J Nippon Med. Sch. 2002, 69(1) 13-18.

257. SWAFFAR S.D., ANG. CH. Y., DESAI P.B., ROSENTHAL G.A. Inhibition of the growth of human pancreatic cancer cells by the arginine antimetabolite L-Canavanine. Cancer Research 1994, 54, 6045-6048.

258. TANAKA M, TSUDA A, IDA Y, USHIJIMA I, TSUJIMARU S, NAGASAKI N. Methionine-enkephalin inhibits stress-induced increases in noradrenaline turnover in brain regions of rats. Jpn J Pharmacol., 1985, 37(1):117-9.

259. TESKEY GC, KAVALIERS M, HIRST M. Social conflict activates opioid analgesic and ingestive behaviors in male mice. Life Sci., 1984; 35:303–315.

260. THORNS V, HANSEN L, MASLIAH E. nNOS expressing neurons in the entorhinal cortex and hippocampus are affected in patients with Alzheimer's disease. Exp Neurol., 1998; 150(1):14-20.

261. TOKUYAMA S, TAKAHASHI M, KANETO H. Participation of GABAergic systems in the production of antinociception by various stresses in mice. Jpn J Pharmacol. 1992;60(2):105-10.

262. TSIGOS C, CHROUSOS GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. J Psychosom Res. 2002 Oct; 53(4):865-71.

263. TSIGOS C, CHROUSOS GP. Physiology of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. Endocrinol. Metab Clin North Am., 1994; 23:451-466.

264. TSUDA A, IDA Y, SATOH H, TSUJIMARU S, TANAKA M. Stressor predictability and rat brain noradrenaline metabolism. Parmacol Biochem Behav 1989; 32: 569-572.

265. UEDA H, MIYAMAE T, FUKUSHIMA N, WATANABE S, MISU Y. Evidence for a metabostatic opioid kappa-receptor inhibiting pertussis toxin-sensitive metabotropic glutamate receptor-currents in Xenopus oocytes. FEBS Lett., 1995a; 375(3):201-5.

266. UEDA H, MIYAMAE T, HAYASHI C, WATANABE S, FUKUSHIMA N, SASAKI Y, IWAMURA T, MISU Y. Protein kinase C involvement in homologous desensitization of delta-opioid receptor coupled to Gi1-phospholipase C activation in Xenopus oocytes. J Neurosci., 1995 b; 15(11):7485-99.

267. URIBE RM, LEE S, RIVIER C. Endotoxin Stimulates Nitric Oxide Production in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus through Nitric Oxide Synthase I: Correlation

with Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activation. Endocrinology, 1999, 140, No 12, 5971-5981.

268. VASWANI KK, RICHARD CW 3RD, TEJWANI GA. Cold swim stress-induced changes in the levels of opioid peptides in the rat CNS and peripheral tissues. Pharmacol Biochem Behav., 1988; 29:163-168.

269. VINCENT SR, KIMURA H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. Neuroscience. 1992; 46(4):755-84.

270. VON BOHLEN UND HALBACH O., R. DERMIETZEL. In: Neurotransmitters and Neuromodulators (II Ed.), 2007.

271. WADA M., "Über Citrullin, eine neue Aminosäure im Presssaft der Wassermelone, Citrullus vulgaris Schrad." Biochem. Zeit. 1930, 224: 420.

272. WANG Q.P., ZADINA J.E., GUAN J.L., SHIODA S. Recent advances in the search for the m-opioidergic system: morphological studies of the endomorphinergic neurons in the central nervous system. Jpn. Pharmacol., 2002, 89:209-215.

273. WATKINS L.R., COBELLI D.A., MAYER D.J. Opiate vs. Nonopiate footshock induced analgesia (FSIA): Descending and intraspinal components. Brain Res 1982, 245, 97-106.

274. WATKINS L.R., JOHANNESSEN J.N., KINSCHECK I.B., MAYER D.J. The neurochemical basis of footshock analgesia: the role of spinal cord serotonin and norepinephrine. Brain Res, 1984, 290, 107-117.

275. WATSON SJ, AKIL H, FISCHLI W, GOLDSTEIN A, ZIMMERMAN E, NILAVER G, VAN WIMERSMA GRIEDANUS TB. Dynorphin and vasopressin: common localization in magnocellular neurons. Science, 1982; 216(4541):85-7.

276. WERKA T, MAREK P. Post-stress analgesia after lesions to the central nucleus of the amygdala in rats. Acta Neurobiol Exp (Wars). 1990;50(1-2):13-22.

277. WERKA T, ZIELIŃSKI K. CS modality transfer of two-way avoidance in rats with central and basolateral amygdala lesions. Behav Brain Res., 1998;93(1-2):11-24.

278. WIEDENMAYER CP, BARR GA. Mu opioid receptors in the ventrolateral periaqueductal gray mediate stress-induced analgesia but not immobility in rat pups. Behav. Neurosci., 2000;114(1):125-36.

279. WIEDENMAYER CP, GOODWIN GA, BARR GA. The effect of periaqueductal gray lesions on responses to age-specific threats in infant rats. Brain. Res. Dev. Brain. Res., 2000;120(2):191-8.

280. WOLF G. Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. Histol Histopathol., 1997; 12:251-261.

281. WOTJAK CT, GANSTER J, KOHL G, HOLSBOER F, LANDGRAF R, ENGELMANN M. Dissociated central and peripheral release of vasopressin, but not oxytocin, in response to repeated swim stress: new insights into the secretory capacities of peptidergic neurons. Neuroscience, 1998; 85(4):1209-22.

282. YAMADA K., NODA Y., NAKAYAMA S., KOMORI Y., SUGIHARA H., HASEGAWA I., NABESHIMA T. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. Br J Pharmacol., 1995; 115:852–858.

283. YUKSEL S, YUREKLI M. The effect of adrenomedullin (ADM) on tyrosine hydroxylase (TH) enzyme activity and blood pressure in cold exposed rats. Endocr. J., 2003; 50(5):553-9.

284. ZADINA JE, HACKLER L, GE LJ, KASTIN AJ. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. Nature, 1997;386(6624):499-502.

285. ZADINA JE, KASTIN AJ, KERSH D, WAYTT A.Tyr-MIF-1 and hemorphin can act as opiate agonists as well as antagonists In the guinea pig ileum. Life Sci. 1992, 51:869-885.

286. ZADINA JE, KASTIN AJ. Interactions of Tyr-MIF-1 at opiate receptor sites. Pharmacol. Biochem Behav. 1986, 25(6):1303-5.

287. ZAMFIROVA R., A. BOCHEVA, M. GEORGIEVA, S. TODOROV. Involvement of presynaptic adrenergic receptors in modulation of Tyr-MIF-1 antinociceptive activity. Bulg.Chem.Commun., 2001, 33(1):106-111.

288. ZHANG A. Z., YANG H. Y., COSTA E. Nociception, enkephalin content and dipeptidyl carboxypeptidase activity in brain of mice treated with exopeptidase inhibitors. Neuropharmacology, 1982, 21, 625-630.

289. ZHANG HQ, RONG PJ, ZHANG SP, AL-CHAER ED, WILLIS WD. Noxious visceral inputs enhance cutaneous tactile response in rat thalamus. Neurosci Lett., 2003a; 336(2):109-12.

290. ZHANG W. T., JIN Z., CUI G. H., ZHANG K.L., ZHANG L., ZENG Y.W., LUO F., CHEN A. C., HAN J.S. Relations between brain network activation and analgesic effect induced by low vs. high frequency electrical acupoint stimulation in different subjects: a functional magnetic resonance imaging study. Brain Res, 2003b, 982, 168-178.

291. ZHANG W.T., JIN Z., HUANG J., ZHANG L., ZENG Y.W., LUO F., CHEN A.C., HAN, J.S. Modulation of cold pain in human brain by electric acupoint stimulation: evidence from fMRI. Neuroreport, 2003c, 14, 1591-1596.

292. ZHANG Y, PARDRIDGE WM. Blood-brain barrier targeting of BDNF improves motor function in rats with middle cerebral artery occlusion. Brain Res. 2006;1111(1):227-9.

293. ZHANG Y, PARDRIDGE WM. Delivery of beta-galactosidase to mouse brain via the blood-brain barrier transferrin receptor. J Pharmacol Exp Ther.2005;313(3):1075-81.

294. ZIMMERMANN M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain, 1983, 16, 109-110.

СПИСЪК НА ПРОЕКТИ, ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Проекти:

1. Договор с МОН към НФ"НИ" *ВУ-Л-04/2005г.* по проект: "Пептиди от семейството на Tyr-MIF-1: ефекти и механизми на действие върху стрес-индуцирана аналгезия"
2. Договор *№ 21/2010* с Медицински Университет, София по проект на тема: „Взаимодействие на някои кратки невропептиди с CB1 рецепторите в periaqueductal gray на плъх при имобилизационен стрес".
3. Договор *№23 /2011г.* с Медицински Университет, София по проект на тема: „Ефекти на невропептидите Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 върху CB1- рецепторите в periaqueductal gray на плъх при студов стрес".

Публикации:

1. Bocheva A, Dzambazova E, **Hadjiolova R,** Traikov L, Mincheva R, Bivolarski I.Effect of Tyr-MIF-1 peptides on blood ACTH and corticosterone concentration induced by three experimental models of stress. **Auton Autacoid Pharmacol., 28(4), 117-23, 2008**.
2. **Hadjiolova R.,** E. Dzhambazova, H. Nocheva, A. Bocheva. Effects of newly synthesized Tyr-MIF-1 analogues in normal conditions and after three models of stress. **Sci Res J SWU, 2(1), 31-36, 2009.**
3. **Hadjiolova R.K**., E.B. Dzhambazova, B.V. Landzhov, A.I. Bocheva, A.B. Bozhilova-Pastirova. Influnce of newly synthesized Tyr-MIF-1's analogues on nitric oxide synthase and tyrosine hydroxylase expression in rat's periaqueductal gray after immobilization stress. **J Biomed Clin Res, 2(2), 77-81, 2010**.
4. **Hadjiolova-Tafradjiiska R**., E. Dzambazova, G. Chergarova. The role of citrulline-containing compounds (citrulline-malate) from faster recovery of muscule fatigue and exhaustion in athletes. **Journal of Sport Science, 2013** (in press).
5. **Hadjiolova R. K.,** Nocheva Ch., Kochev D., A, Bocheva. Effects of Tyr-Cav-MIF-1 and Tyr-Cit-MIF-1 on the endogenous nitric oxide after three models of stress. **Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci** (под печат) (IF = 0.210)

Участия:

1. R. Mincheva, A. Bocheva, Dzambazova E., **R. Hadjiolova,** L. Traikov, I. Bivolarski. Effects of Tyr-MIF-1's peptides on the blood ACTH and corticosterone concentration after three models of stress. VII International Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 8-11 May, 2008.

2. Dzambazova E., A. Bocheva, **R. Hadjiolova**, L. Traikov, R. Mincheva, I. Bivolarski. Kyotorphin and D-kyotorphin inhibited the rising in ACTH and corticosterone plasma concentrations after three models of stress. 6th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, Patras, Greece, 18-20 May, 2008.

3. Dzambazova E. B., Bocheva A. I., **Hadjiolova R**. K., Kamenov A. and Nikolova V.P. Involvement of endogenous nitric oxide in the effects of kyotorphin on immobilization and cold stress-induced analgesia. 5th Bulgarian Peptide Symposium, Bachinovo, Bulgaria, 28 – 30 May, 2008

4. Ovtsharoff W., Dzambazova E., Landzhov B., Bocheva A., **Hadjiolova R**., Nikolova V. Effects of D-kyotorphin on NADPH-d reactive neurons in rat's PVN after two stress models. III Koprivshtitsa morphological days. VII National conference of anthropology, 30 May -1 June, 2008.