



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**  
**Медицински факултет**  
**Катедра по патофизиология**

---

**Кристина Живкова Грънчарска**

**ОЦЕНКА НА ДЪЛБОКА МЕХАНИЧНА БОЛКА И ПРОМЕНИ  
ПРИ СУБМАКСИМАЛНИ ФИЗИЧЕСКИ НАТОВАРВАНИЯ  
ПРИ ЗДРАВИ НЕТРЕНИРАНИ МЪЖЕ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**за присъждане на образователната и научна степен “ДОКТОР”  
по научната специалност патофизиология**

**Научни ръководители:** проф. д-р Невена Пенчева  
проф. д-р Адриана Бочева, д.м.

**Официални рецензенти:** проф. д-р Александър Стойнев, дмн  
проф. д-р Николай Бояджиев, д.м.

София  
2014 година

Дисертационният труд съдържа 176 машинописни страници, включващи 40 фигури и 19 таблици. Библиографският списък съдържа 321 литературни източника на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет към Катедра по патофизиология, Медицински университет - София на 04.04.2014 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на **29.09.2014** г. от **14.00** часа в 2-ра Аудитория на Медицински факултет, Медицински Университет - София, ул. „Здраве“ 2, съобразно Заповед на ректора № РК36-969/30.05.2014 г. пред научно жури в състав:

**Председател:**

1. Проф. д-р Александър Стойнев, д.м.н. – Катедра по патофизиология, МФ, МУ- София (рецензия);

**Членове:**

2. Проф. д-р Адриана Бочева, д.м. – Катедра по патофизиология, МФ, МУ-София (становище);

3. Проф. д-р Невена Пенчева – ЮЗУ „Неофит Рилски“ - Благоевград (становище);

4. Проф. д-р Николай Бояджиев, д.м. – Медицински университет, Пловдив (рецензия);

5. Доц. д-р Анелия Димитрова, д.м. – Медицински университет, Плевен (становище).

**Резервни членове:**

1. Доц. д-р Мария Тодорова, д.м. – Катедра по патофизиология, МФ, Медицински университет-София, вътрешен;

2. Доц. д-р Емилия Цакова-Лакова, д.м. - Медицински университет, Плевен, външен.

*Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ-София и са на разположение на интересувашите се в Катедрата по патофизиология, МФ, МУ – София, ул. „Здраве“ 2.*

- *Изказвам своята най-искрена и дълбока благодарност на научните ми ръководители проф. д-р Невена Пенчева и проф. д-р Адриана Бочева за идеите и подкрепата при разработването и оформянето на настоящия дисертационен труд, както и за съветите, конструктивната критика и търпението, без които този труд би бил възможен.*
- *Изказвам благодарност на проф. д-р Александър Стойнев и всички колеги от Катедрата по патофизиология за подкрепата им по време на разработването на настоящата дисертация и възможността да завърша докторантското си обучение.*
- *Изказвам благодарност на проф. Mark Johnson и целия екип от Pain Research Centre, Leeds Metropolitan University, UK за възможността да проведа експериментална работа в този център.*
- *Изказвам благодарност на доц. д-р Бойчо Ланджов и проф. Анастасия Божилова от Катедрата по анатомия, хистология и ембриология на МУ – София, за съдействието му при извършване на хистохимичните изследвания.*
- *Благодаря на сина, семейството и приятелите си за търпението, разбирането и подкрепата.*

## СЪДЪРЖАНИЕ

1.	ВЪВЕДЕНИЕ	6
2.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО	7
3.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	9
4.	РЕЗУЛТАТИ	12
4.1.	Ефекти на хипоалгезия индуцирана при физическо натоварване	12
4.2.	Изследване на болковата перцепция при имобилизация и при физическо натоварване при експериментални животни	18
4.3.	Изследване на хипералгезия при ексцентрични мускулни съкращения – мускулна треска (DOMS)	25
5.	ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ	29
6.	ИЗВОДИ	39
7.	ПРИНОСИ	41
8.	БИБЛИОГРАФИЯ	42
9.	СПИСЪК НА ПРОЕКТИ, ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	43

## СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯ

### На кирилица

АКТХ – аденокортикотропен хормон  
ВНС – вегетативна нервна система  
ГАМК – γ-аминомаслена киселина  
ЕК – ендоканабиноиди  
ЕКС – ендогенна канабиноидна система  
ЕОС – ендогенна опиоидна система  
СИА – стрес-индуцирана аналгезия  
ХИФН – хипоалгезия индуцирана при физическо натоварване  
ФН – физическо натоварване  
ЦНС – централна нервна система

### На латиница

2-AG – 2 – arachidonylglycerol  
CB 1 – канабиноиден рецептор тип 1  
CB 2 – канабиноиден рецептор тип 2  
DOMS – delayed onset of muscle soreness  
GS – m. gastrocnemius-m. soleus  
HP- латентност –определен с термичен дразнител чрез hot-plate  
тест  
PAG - periaqueductal gray  
PFC – префронтален кортекс  
TRPV1- transient receptor potential cation channel subfamily V  
member 1(vanilloid receptor 1)  
RVM – rostral ventromedial medulla  
PP – болков праг, определен с механичен дразнител чрез raw-  
pressure тест

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Промените в болковата перцепция, индуцирани при физическо натоварване са актуални, защото корелират с някои фундаментални страни на скелетно-мускулната работа, с методите в рехабилитационната практика, както и със спортно - тренировъчния процес. Тези промени са най-изразени при стимулация на дълбоките механорецептори, но са и са разнопосочни. Те предизвикват хипоалгезия, възникваща по механизма на стрес-индуцираната аналгезия, както и хипералгезия (DOMS), която се генерира със забавено начало чрез микроувреди, отключващи целесъобразна и уникална адаптация и ремоделиране в различни структури на опорно-двигателния апарат. Тези аспекти на болката не са изследвани в България, а техните многообразни ефекти и механизми са недостатъчно изучени и изяснени в литературата.

Известното състояние в литературата "runner's high"/ "exercise's high", което обобщава различните емоционални и физически промени при натоварване, дълго време се интерпретираше единствено с промени на плазмените нива на  $\beta$ -ендорфина („ендорфинова” хипотеза). През последните 10 години обаче, вниманието е насочено към по-комплексна модулацията на тези промени и към ендогенно освобождаваните канабиноиди при физическо усилие.

Интересът ни към DOMS беше насочен към проявленията на тази реактивност при преобладаващи ексцентрични мускулни съкращения, които са в основата на адаптационни и регенеративни процеси в скелетните мускули, тясно свързани с мускулната хипертрофия, генериране на сила при паралелно участие на еластични компоненти и други.

## **2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО**

Цел на настоящият труд бе:

1. Да се оптимизират и развият модели за:
  - ✓ оценка на експериментална болка при хора чрез стимулация на дълбоки механорецептори;
  - ✓ индуциране на DOMS на единичен мускул и на група мускули;
2. Да се проследят промените в дълбоката механична болка при физическо натоварване на здрави нетренирани мъже като:
  - ✓ хипоалгезия, в резултат на стрес-индуцирана аналгезия;
  - ✓ хипералгезия, в резултат на превалиращи ексцентрични мускулни съкращения, които преизвикват забавено начало на мускулна болезненост (DOMS).
3. Да се изучат аналгетичните ефектите на ендогенна опиоидната и канабиноидната системи върху експериментални животни при стрес-индуцирани реакции:
  - ✓ провокирани от имобилизационен стрес и
  - ✓ физическо натоварване - плуване.

## **ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО**

Съобразно целта на изследването, бяха поставени следните задачи:

- Да се изследва базалната ноцицепция при експерименти с хора и сравнително да се проследят болковите прагове между натоварен и ненатоварен крайник, доминантен и недоминантен

крайник и отделни области на мускулите (инсерция, инервационна зона, залавно място);

➤ Да се изследват хипоалгезични промени в болковата перцепция при субмаксимално натоварване чрез прилагане на различни техники за оценка на дълбока механична болка (палпация; пресорна алгометрия с апарат за кръвно налягане; ръчна алгометрия с ръчен алгометър и компютъризирана система за пресорна алгометрия);

➤ Да се разработят и изследват модели на DOMS при стимулация на единичен мускул и на група мускули;

➤ Да се сравнявят на болкови параметри при тренирани и нетренирани лица;

➤ Да се изследва базалната ноцицепция при експериментални животни и да се проучи влиянието на ендогенна опиоидната и канабиноидната система при стрес-индуцирана антиноцицепция, провокирани от имобилизация и физическо натоварване.

### 3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 3.1. Изследвани лица

Изследванията с хора са проведени в Центъра за функционални изследвания в спорта и кинезитерапията и/или Лабораторията по физиология към Факултет „Обществено здраве и спорт“ на Югозападния университет „Неофит Рилски“ в Благоевград, в периода 2007-2010 година.

Експериментите бяха извършени върху здрави, нетренирани и тренирани (професионални танцьори) мъже. (редовно физическо натоварване, повече от 2-3 пъти седмично, с продължителност  $\geq 2$  часа), доброволци, на възраст 19-38 години.

#### 3.2. Методи за оценка на експериментална болка при механична стимулация:

- ✓ *Оценка на болков рейтинг чрез палпация.*
- ✓ *Оценка на болков праг, болков толеранс и болков рейтинг чрез турникетова техника с апарат за кръвно налягане.*
- ✓ *Оценка на болков праг, болков толеранс и болков рейтинг чрез турникетова техника с манометър до 600 mmHg.*
- ✓ *Оценка на болков праг и болков толеранс с компютъризирана система за пресорна алгометрия.*  
Оценката на болковия стимул се провеждаше с микроконтролерно базирана система за пневматична пресорна алгометрия (Stoilov et al., 2009).
- ✓ *Оценка на болков праг чрез ръчен електронен алгометър Somedic.*

#### 3.3. Модели на физическо натоварване:

- ✓ *Стъпаловидно натоварване до отказ с велоергометър.*
- ✓ *Стъпаловидно натоварване до отказ с тредмил.*
- ✓ *Натоварване с изокинетичен динамометър*
- ✓ *Тест на Купър.*

### **3.4. Натоварване с преобладаващи ексцентрични мускулни съкращения:**

- ✓ *Модел на флексорите на лакътя с тежест.*
- ✓ *Модел на флексорите на лакътя с изокинетичен динамометър.*
- ✓ *Модел с ръчен динамометър на мускул *flexor digitorum profundus*.*

### **3.5. Ноцицептивни тестове при имобилизационен стрес и натоварване при плъхове**

Изследванията бяха проведени върху мъжки бели плъхове линия Wistar (180-200g) в Лабораторията по стрес-индуцирана аналгезия към катедра „Патофизиология“ при МФ, МУ – София. Всички опити бяха провеждани между 9.00 и 12.00 ч. и бяха извършени съгласно изискванията на Международната Асоциация за изследване на болката (IASP) (Zimmermann M., 1983) и ЕКНМ към МУ – София.

#### **Ноцицептивни тестове**

- ✓ **Метод с прилагане на механично дразнене – *Paw pressure (PP) test*** (Randall-Selitto, 1957).
- ✓ **Метод с прилагане на термично дразнене – *Hot plate (HP) test*.**

#### **Модели на имобилизационен стрес**

- ✓ **Остър имобилизационен стрес** – 3 часа/еднократно.
- ✓ **Хроничен имобилизационен стрес** – 3 часа/4 последователни дни

#### **Модели на физическо натоварване с плуване**

- ✓ **Еднократно плуване** – 15 мин/еднократно (във вода с температура 30-32°C).
- ✓ **Десетдневно плуване** – 15 мин/10 последователни дни (във вода с температура 30-32°C).

### **3.6. Имунохистохимично изследване**

Приготвяха се серийни срези на замразяващ микротом (*Reihart-Jung*), като всеки седми срез с дебелина 40  $\mu\text{m}$ , се използваше при изследването. Срезите се правеха на ниво от +2.2 до +3.2 mm от брегмата (bregma).

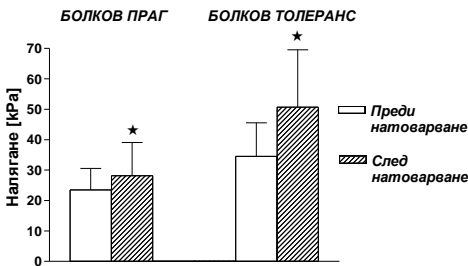
### **3.7. Статистически подходи**

За обработка на експерименталните данни използвахме статистическия пакет Prism. Параметрите са представени като  $\bar{X} \pm \text{SD}$ . Оценката за различия между средните стойности е проведена с методите на непараметричната статистика - тестовете на Wilcoxon (за зависими извадки) и Mann-Whitney (за независими извадки) при 2 групи. При повече от 2 групи използвахме т. нар. ANOVA-тестове на Kruskal-Wallis при независими извадки и Friedman тест при зависими. При анализа на различия между повече от две групи се прилагаше тест на Dunns.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Ефекти на хипоалгезия индуцирана при физическо натоварване

**Промени в болковите параметри при натоварване.** Стойностите на болковия праг и на прага на болковия толеранс се повишават статистически достоверно ( $p < 0.05$ ) след стъпаловидно, велоергометрично натоварване (Фигура 1). Повишението на болковия праг е с  $19.79 \pm 2.40$  %, а на прагът на болковия толеранс с  $46.93 \pm 3.94$  %. Получените данни доказват хипоалгезичния ефект на субмаксимално велоергометрично натоварване, който е по-изразен по отношение на болковия толеранс, респективно аналгезията се проявява в по-голяма степен при по-силните механични стимули и вероятно модулира издръжливостта при натоварване.

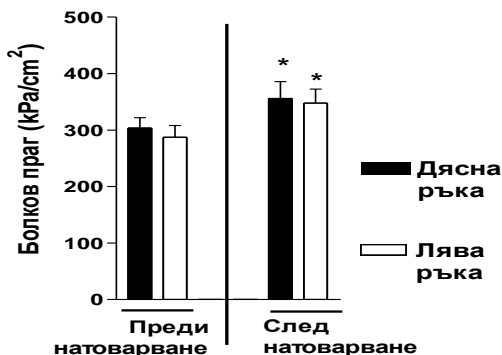


**Фигура 1.** Стойности ( $\bar{X} \pm SD$ ) на болков праг (PPT) и праг на болков толеранс (PTT) измерени преди и след натоварване, с компютъризирана система за пресорна алгометрия. \*Статистически значими различия в сравнение със стойностите преди натоварване. (Wilcoxon тест  $p < 0.05$ ).

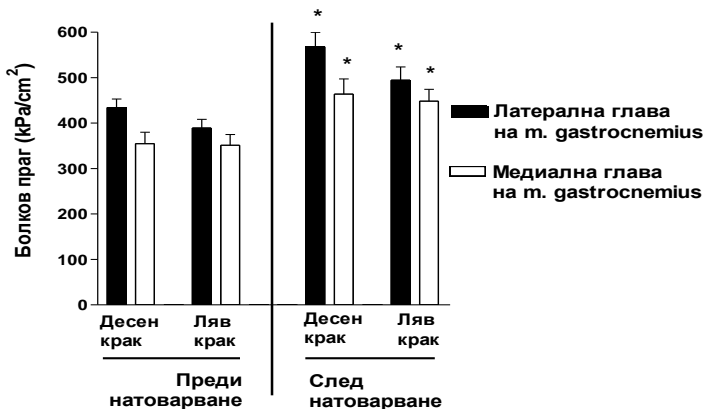
максимално натоварване са представени на Фигура 2 и Фигура 3, заедно с тези преди натоварване. Те показват, че хипоалгезията на двата крака и в двете глави са статистически достоверни ( $p < 0.05$ ). Поради субективния характер на болковото усещане, вариационните коефициенти на средните стойности на болковите прагове, както на мускулите на ръцете, така и на краката, бяха високи.

### Изследване на връзката между силови изокинетични характеристики и параметри на болката при натоварване.

Сравнителното представяне на болковите прагове при механична стимулация в двете глави на GS на двата крака и на двете ръце, в областта на m. biceps brachii, 15 min след



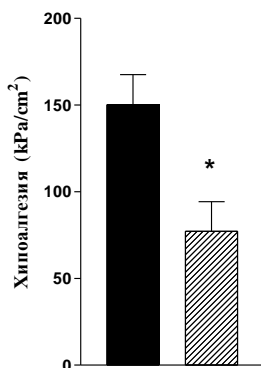
**Фигура 2.** Болкови прагове, измерени с ръчен алгометър(Somedic) в коремчето на *m. biceps brachii* върху дясна (доминантна) и лява ръка преди и след натоваарване с максимален тест. \*Статистически достоверна разлика в сравнение със стойностите преди натоваарване (ANOVA и Tukey тест).



**Фигура 3.** Болкови прагове, измерени с ръчен алгометър (Somedic) в коремчето на латералната и медиалната глава на *m. gastrocnemius* върху десен (доминантен) и ляв крак, преди и след натоваарване с максимален тест. \*Статистически достоверна разлика в сравнение със стойностите преди натоваарване (ANOVA и Tukey тест).

За да оценим степента на хипоалгезията и да избегнем големите индивидуални различия в праговете, ние изчислихме

разликата между стойността на болковия праг след натоварване и тази преди натоварване за всяко лице. Това ни позволи да определим степента на хипоалгезия в kPa/s при активно работещи и неактивно работещи мускули по време на натоварването. От Фигура 4 се вижда, че в активно работещия по време на натоварването *m. gastrocnemius* – латерална глава на десния, доминантен крак, степента на хипоалгезия е значително по-голяма от тази на неработещия *m. biceps brachii* на доминантната ръка. Чрез този начин на количествено представяне на степента на хипоалгезия при натоварване ние потърсихме корелации с динамометрични характеристики на различни групи мускули.



**Фигура 4.** Сравнително представяне на степента на хипоалгезията на *m. gastrocnemius* – латерална глава, доминантен крак – черно стълбче и *m. biceps brachii*, дясна (доминантна) ръка – заштриховано стълбче. \*Статистически достоверна разлика в сравнение със стойностите преди натоварване (Mann-Whitney test).

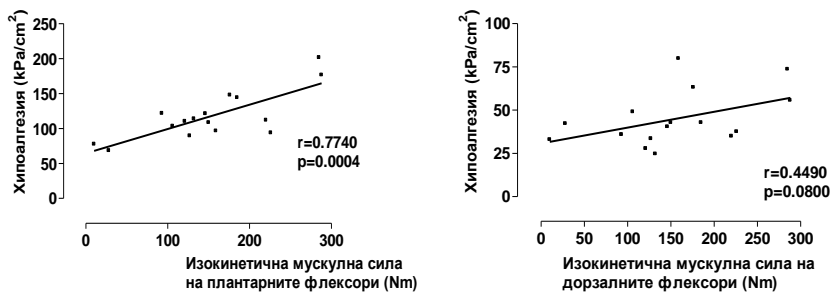
на базалната ноцицепция и се активират при физическо натоварване. Следователно размерът на хипоалгезията индуцирана при натоварване, би могла да бъде критерий за активността на ендогенни модулиращи болката системи и в някаква степен за нивото на физическа активност и ниво на тренираност. В тази връзка, беше изследвана корелацията между изокинетичната сила на флексорите и екстензорите на коляното и на плантарните и дорзални флексори на глезена на десен крак от една страна и хипоалгезията индуцирана при

### Корелации между хипоалгезия индуцирана при натоварване и силови характеристики на скелетни мускули при концентрични съкращения.

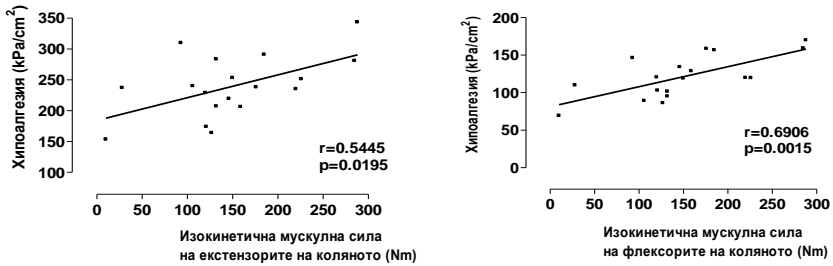
Едно основно предположение бе, че генерирането на сила при здравия нетрениран човек, като основна функция на скелетния мускул, се модулира от активността и на ендогенни системи които участват във формирането

максимално натоварване, тествана чрез определяне на болковите прагове преди и след максимално натоварване върху латералната глава на GS на десен крак, от друга. Последната беше избрана, защото беше най-манифестирана, както беше описано по-горе.

Корелации между силата на посочените мускулни групи и другите болкови параметри – болков праг и болков толеранс, измерени при натоварване на латералния *gastrocnemius*, също бяха изчислени с коефициента на Pearson, но те показаха, че не се наблюдава зависимост между тях. Не се наблюдаваше корелация и между размера на хипоалгезията и силата на дорзалните флексори на глезена на същия крак. Обаче, по отношение на другите изследвани мускулни групи, бяха установени умерени до значителни корелации. Получените стойности за коефициента  $r$ , който показва силата и посоката на намерените корелации, за коефициента  $r^2$ , който е критерий за т.нар. обяснена дисперсия и за коефициента за неопределеност –  $k^2$ , са представени графично на зависимостите е показан на Фигури 5 и 6.



**Фигура 5.** Корелационни зависимости между: - хипоалгезията, индуцирана при максимален тест на тредмил и измерена в коремчето на латералната глава на *t. gastrocnemius* на десен крак; и – торгът на плантарни (ляво) и дорзални (дясно) флексори на глезенна става (при скорост 30 °/sec) на десен крак при концентрично, изокинетично съкращение.

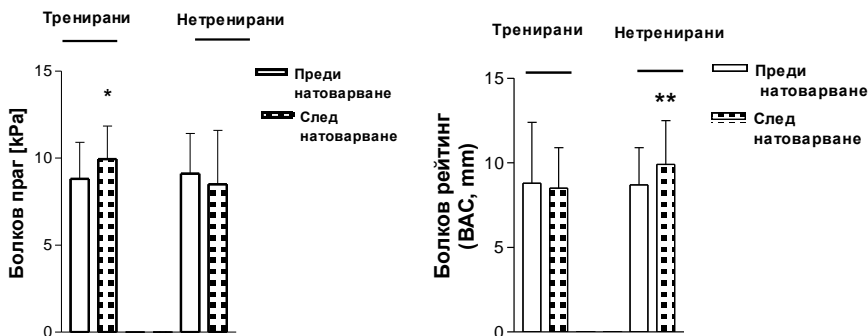


**Фигура 6.** Корелационни зависимости между: - хипоалгезията, индуцирана при максимален тест на тредмил и измерена в коремчето на латералната глава на *m. gastrocnemius* на десен крак; и – торгът на на екстензорите (ляво) и флексорите (дясно) на колянна става (при скорост 60 °/sec) при концентрично, изокинетично съкращение.

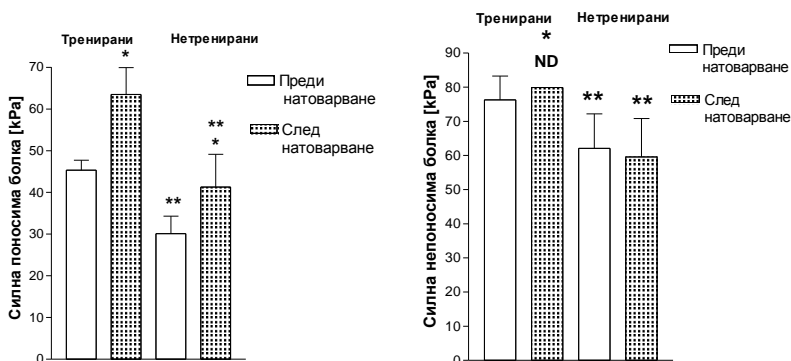
Значителна е корелацията и при флексорите на коляното, докато параметрите на зависимостта при екстензорите показват, че влиянието на невключените при изследването фактори върху силата на мускулите (или т.нар. необяснена дисперсия) е значително по-голямо (повече от 70 %), отколкото ролята на потенциала за индуциране на хипоалгезия, тестван с натоварване. В този случай изследваната зависимост е умерена.

### Сравнителни изследвания на болкови параметри при нетренирани и тренирани лица

На Фигура 7 и 8 са представени стойностите на следните болкови параметри: болков праг, силна поносима, силна непоносима болка и болков рейтинг, определени преди и след стъпаловидно натоварване до отказ при професионални танцьори и нетренирани лица. Танцьорите показаха по-високи стойности при силната поносима болка, както в покой, така и след натоварването, но няма разлика между болковите прагове на двете изследвани групи преди и след физическото натоварване.



**Фигура 7.** Стойности ( $\bar{X} \pm SD$ ) на болков праг (kPa) и болков рейтинг (BAS, mm), определени с турникетова техника и манометър до 600 mmHg, при нетренирани и тренирани, преди и след стъпаловидно натоварване до отказ. \*Статистически значима разлика между стойностите на болковия праг преди и след натоварване в двете групи (Wilcoxon тест). \*\* Статистически значима разлика между стойностите при тренирани и нетренирани (Mann-Whitney U тест) ( $p < 0.05$ ).



**Фигура 8.** Стойности ( $\bar{X} \pm SD$ ; kPa) на силна поносима болка и на силна непоносима болка определени с турникетова техника и манометър до 600 mmHg, при нетренирани и тренирани, преди и след стъпаловидно натоварване до отказ. \*Статистически значима разлика между стойностите на болковия праг преди и след натоварване в двете групи (Wilcoxon тест). \*\* Статистически значима разлика между стойностите при тренирани и нетренирани (Mann-Whitney U тест) ( $p < 0.05$ ).

На Фигура 7 и Фигура 8 се вижда, че тренираните имат статистически достоверно по-високи стойности с 30% на болковия праг ( $p < 0.05$ ), в сравнение с нетренираните, докато стойността на силната непоносима болка (болковия толеранс) при спортистите е с около 25% по-висока ( $p < 0.01$ ). Хипоалгезичният ефект на

максималното натоварване е по-изразен при тренирани, а тъй като и болковят им толеранс е по-висок в покой. Следователно, може да се предположи, че това се дължи на по-високи плазмени нива на ендогенните опиоиди и канабиноиди в резултат на системно трениране.

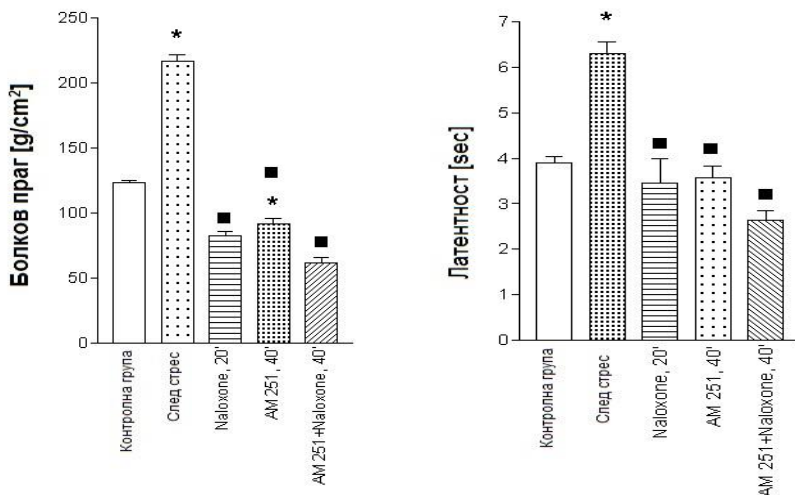
#### **4.2. Изследване на болковата перцепция при имобилизация и физическо натоварване при експериментални животни**

**Остър имобилизационен стрес.** На Фигура 9А и Фигура 9В са представени резултати от изследване на участието на ендоепиоидите и ендоканабиноидите и взаимодействието на двете системи при модулация на болковите стимули (термични и механични) при остър имобилизационен стрес.

Болковият праг се понижава ( $p < 0.05$ ) след въвеждане на налоксона, в сравнение със стойността му след имобилизационния стрес с  $63.5 \pm 7.8\%$  и с  $57.2 \pm 6.4\%$  след инжектирането на AM251. При комбинираното въвеждане на двете вещества понижението на болковия праг е с  $73.1 \pm 8.3\%$ , т.е. и опиоидните рецептори и канабиноидните рецепторите участват в антиноцицептивната модулация на болковата перцепция след остър имобилизационен стрес. Може да се предположи, че тези две системи си взаимодействат при този вид аналгезия, въпреки, че няма статистически достоверна разлика между групите с налоксон и AM251 и тази с комбинирано инжектиране на двата блокера (Фигура 9А).

Стойностите на латентността също се понижават ( $p < 0.05$ ) с  $44.2 \pm 3.8\%$  след инжектиране на опиоиден блокер, с  $44.5 \pm 4.6\%$  след i.p. въвеждане на AM251 и с  $59.7 \pm 6.2\%$  след едновременно въвеждане и на двата блокера. Резултатите показват, че анти-механичната болкова модулация от ендогенни опиоиди и канабиноиди е по-силно изразена от анти-термичната и вероятно ендогенна опиоидна система упражнява по-силно изразен

антиноцицептивен ефект върху механични стимули, в сравнение с ефекта на канабиноидната.



**Фигура 9А.** Промени в болковия праг при механичен стимул, преди, веднага след острата имобилизация и след i.p. въвеждане на опиоиден и/или канабин-оиден блокер. \*Статистически значима разлика при сравнение с контролната група (преди имобилизация); ■ Статистически значима разлика при сравнение със стойностите след имобилизационния стрес (Kruskal-Wallis, Dunns's test) ( $p < 0.05$ ).

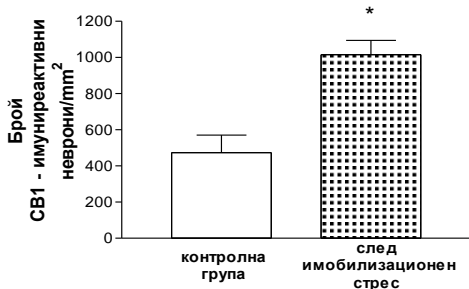
**Фигура 9В.** Промени в болковия праг при термичен стимул, преди, веднага след острата имобилизация и след i.p. въвеждане на опиоиден и/или канабиноиден блокер.\*Статистически значима разлика при сравнение с контролната група (преди имобилизация); ■ Статистически значима разлика при сравнение със стойностите след имобилизационния стрес (Kruskal-Wallis, Dunns's test) ( $p < 0.05$ ).

Антиноцицептивно взаимодействие при модулацията на ноцицептивния праг между ендогенните опиоиди и канабиноиди се наблюдаваше, както при механична, така и при термична алгогогенна стимулация, след остър имобилизационен стрес.

### Имунохистохимично изследване на CB1 канабиноидни рецептори в префронтален кортекс на плъхове, след остър имобилизационен стрес

Резултатите от имунохистохимично изследване показват специфично разположение на CB1-имунореактивни неврони в

отделните слоеве на mPFC, както при контролните животни, така и при тези изложени на остър имобилизационен стрес, като тяхната гъстота е по-голяма в дълбоките слоеве на кората. При това морфометрично изследване, установихме и значителна разлика в гъстотата на CB1-имунопозитивните неврони в mPFC между контролните животни и тези подложени на остър имобилизационен стрес, т.е. плътността на CB 1 рецепторите след остър стрес е по-голяма ( $p < 0.05$ ) (Фигура 10).



**Фигура 10.** Средна плътност на CB1-имунореактивните неврони в mPFC при контролна група (без стрес) и при група след остър имобилизационен стрес. \*Статистически значима разлика ( $p < 0.05$ ) при сравнение с контролната група. (Mann-Whitney U test).

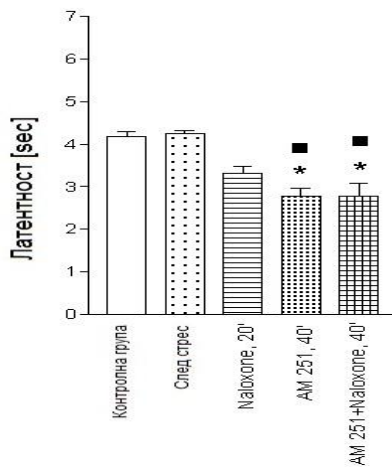
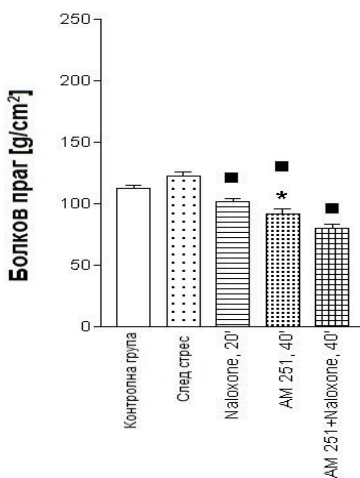
Независимо, че броя на CB1 рецепторите в префронталния кортекс бе увеличен, то експерименталните резултати не показаха изразена антиноцицепция както с термичен, така и с механичен стимул при въвеждане на канабиноидния антагонист т.е. участието на канабиноидна модулация не беше изразено.

Това може да се обясни с фактът, че префронталния кортекс участва предимно в субективната оценка на болковия стимул и може би има по-голяма роля при изследване на болковия толеранс, а не при проследяване на промените при болковите прагове след остър имобилизационен стрес.

### **Хроничен имобилизационен стрес.**

Стойностите на болковия праг при въвеждане на AM251 се понижиха ( $p < 0.05$ ) с  $33.4 \pm 4.1\%$  спрямо тези непосредствено след края на хроничната имобилизация, а при комбинирано въвеждане на двете субстанции с  $38.1 \pm 5.4\%$ . Понижението на болковия праг с  $12.4 \pm 3.2\%$  на фона на налоксон не беше статистически достоверно (Фигура 11A). В стойностите на НР-латентността също бяха

понижени ( $p < 0.05$ ) след въвеждането на блокерите, при AM251, то е с  $39.5 \pm 5.2$  %, докато при комбинирано въвеждане е с  $25.2 \pm 4.8$  %. Понижението с  $18.9 \pm 3.2$  % след инжектиране на налоксон не е статистически достоверно (Фигура 11B).



**Фигура 11А.** Промени в болковия праг при механичен стимул, преди, веднага след хронична имобилизация и след i.p. въвеждане на опиоиден и/или канабиноиден рецепторен блокер. \*Статистически значима разлика ( $p < 0.05$ ) при сравнение с контролната група (преди имобилизация); ■ Статистически значима разлика ( $p < 0.05$ ) при сравнение със стойностите след имобилизационния стрес. (Kruskal-Wallis ANOVA, Dunns's test).

**Фигура 11В.** Промени в болковия праг при термичен стимул, преди, веднага след хронична имобилизация и след i.p. въвеждане на опиоиден и/или канабиноиден рецепторен блокер. \*Статистически значима разлика ( $p < 0.05$ ) при сравнение с контролната група (преди имобилизация); ■ Статистически значима разлика ( $p < 0.05$ ) при сравнение със стойностите след имобилизационния стрес. (Kruskal-Wallis ANOVA, последвана от Dunns's test).

Резултатите показват, че при хроничен имобилизационен стрес хипоалгезичните ефекти са медиирани предимно от ендогенните CB1 рецептори. Прави впечатление, че антиноцицептивните ефекти при въвеждането на налоксон или AM251 са по-изразени при влиянието на механичните стимули в сравнение с термичните.

Взаимодействие между ендоканабиноидна и опиоидна системи може да се допусне само по отношение на механичната болкова модалност.

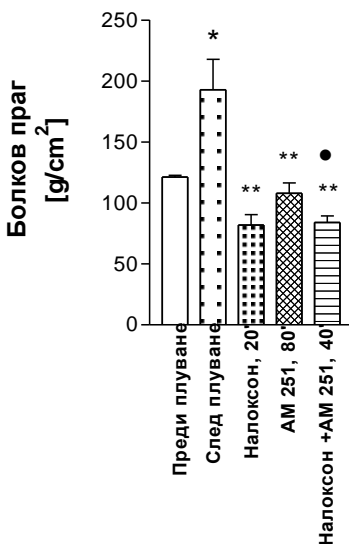
### **Резултати от изследвания при еднократно плуване.**

Стойностите на болковия праг се понижиха статистически достоверно ( $p < 0.01$ ) след въвеждане на налоксон, с  $57.0 \pm 5.3$  % на 80-та min от въвеждането на AM251, болковия праг бе понижен с  $43.6 \pm 11.3$  %, а при инжектиране на двата инхибитора понижението беше с  $56.4 \pm 5.6$  %, спрямо тези след плуване (Фигура 12A). Понижението в стойностите на латентността беше с  $66.4 \pm 4.6$  % при въвеждане на неселективен опиоиден рецепторен антагонист, с  $60.6 \pm 7.2$  % 40 min след инжектиране на AM251 и с  $57.9 \pm 8.1$  % при едновременно въвеждане на двата антагониста. (Фигура 12B).

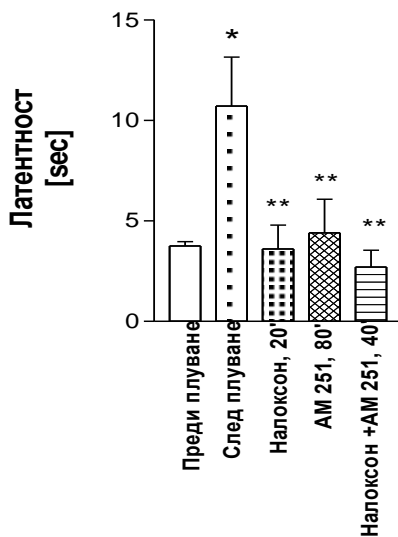
Резултатите показват, че антиноцицептивният ефект след еднократно плуване се модулира предимно от опиоидната ендогенна система при механични болкови стимули, докато в модулацията на термични алгогенни стимули вероятно участват и ендоканабиноиди.

**Резултати от изследвания при десетдневно плуване.** На фигура 12A са представени резултатите от изследване на промените в болковия праг след въвеждане на налоксон, AM251 и комбинацията от двата блокера. Поради продължителната хипоалгезия след въвеждане на AM251, при сравняване на стойностите между отделните вещества е взета тази на 160-та min след въвеждането му.

Статистически достоверно ( $p < 0.001$ ) беше понижението на болковия праг спрямо стойността му след плуване при въвеждане на налоксон, AM251 и при едновременното въвеждане на двата блокера, като стойностите бяха  $198.0 \pm 13.0$  g/cm<sup>2</sup>,  $82.0 \pm 8.4$  g/cm<sup>2</sup>,  $108.0 \pm 8.4$  g/cm<sup>2</sup> и  $80.0 \pm 8.4$  g/cm<sup>2</sup>, съответно.



**Фигура 12А.** Стойности ( $\bar{X} \pm SD$ ) на болков праг преди, веднага след плуване, 20 тiп след инжектиране на 2 mg/kg налоксон, 80 тiп след въвеждане на 1.25 mg/kg AM251 и 40 тiп след едновременното въвеждане на двете вещества. \*Статистически значима разлика при сравнение със стойностите преди плуване. •Статистически значима разлика (при сравнение със стойностите 80 тiп след въвеждане на AM251; \*\*Статистически значима разлика при сравнение със стойностите веднага след плуване. (Tukey's test), ( $p < 0.01$ )



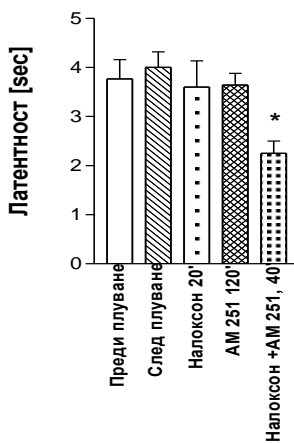
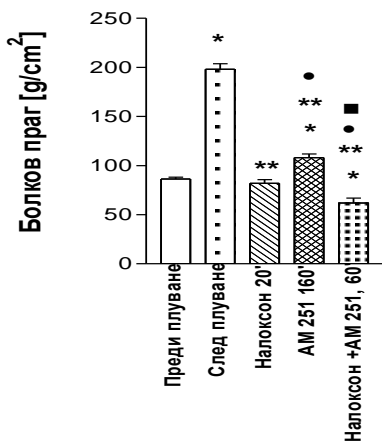
**Фигура 12В.** Стойности ( $\bar{X} \pm SD$ ) на латентност преди, веднага след плуване, 20 тiп след инжектиране на 2 mg/kg налоксон, 80 тiп след въвеждане на 1.25 mg/kg AM251 и 40 тiп след едновременното въвеждане на двете вещества. \*Статистически значима разлика ( $p < 0.001$ ) при сравнение със стойностите преди плуване. \*\*Статистически значима разлика ( $p < 0.05$ ) при сравнение със стойностите веднага след плуване (Tukey's test).

Най-силно беше понижението на болковите прагове след инжектиране на налоксон и комбинацията от двата блокера, с  $57.0 \pm 7.6\%$  и  $56.4 \pm 5.8\%$ , съответно. Вероятно опиоидите участват в по-голяма степен при модулация на механичните болкови стимули, в сравнение с канабиноидите. Прави впечатление, че и двете системи участват в болковата перцепция. Статистически достоверна беше разлика ( $p < 0.05$ ) между стойностите на болковия праг: (а) след въвеждане на налоксон ( $82.0 \pm 8.4 \text{ g/cm}^2$ ); (б), след въвеждане на AM

251 ( $108.0 \pm 8.4 \text{ g/cm}^2$ ); и (в) при едновременно въвеждане на двата блокера ( $80.0 \pm 8.4 \text{ g/cm}^2$ ; Фигура 13А).

При хроничното плуване НР-латентността не се променя статистически достоверно, но при инжектиране на АМ251+налуксон НР-латентността е статистически достоверно ( $p < 0.05$ ) понижена.

Вероятно, при модулация на ноцицепцията при хронично плуване е налице силно изразен синергичен ефект на взаимодействие между ЕОС и ЕКС (Фигура 13В).



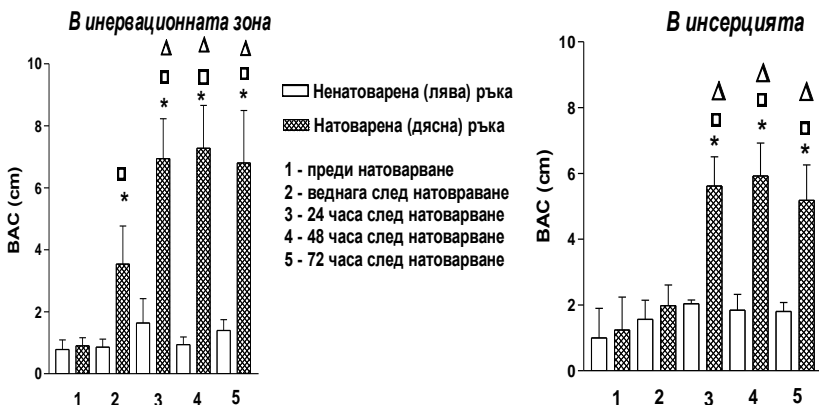
**Фигура 13А.** Стойности на болков праг преди, веднага след плуване, 20 min след инжектиране на 2mg/kg налуксон, 160 min след въвеждане на 1.25mg/kg АМ251 и 60 min след едновременното въвеждане на двата блокера. Статистически значима разлика ( $p < 0.001$ ) при сравнение със стойностите \*преди плуване. •след въвеждане на 2 mg/kg налуксон; Статистически значима разлика ( $p < 0.001$ ) при сравнение със стойностите \*\*веднага след плуване, \* след въвеждане 1.25 mg/kg АМ251. One-way ANOVA, Tukey's test.

**Фигура 13В.** Стойности на латентност преди, веднага след плуване, 20 min след инжектиране на 2mg/kg налуксон, 120 min след въвеждане на 1.25mg/kg АМ251 и 40 min след едновременното въвеждане на двата блокера. \*Статистически значима разлика ( $p < 0.001$ ) при сравнение със стойностите след плуване. One-way ANOVA, Tukey's test.

### 4.3. Хипералгезия при ексцентрични мускулни съкращения – мускулна треска (DOMS)

При флексори на мишницата с изокинетичен динамометър. Болковият праг при този модел на DOMS беше измерен с алгометър Somedic в различни точки на *m. biceps brachii* (инсерцията, инервационна зона, *caput longum* и *caput breve*).

На Фигура 14 са представени сравнителните данни за болковата сетивност, оценени чрез палпация и ВАС в инервационната зона и инсерцията на *m. biceps brachii* между ненаатоварената лява ръка и дясната ръка, която беше подложена на стандартизиран протокол за натоварване с изокинетичен динамометър при преобладаващи ексцентрични мускулни съкращения.



**Фигура 14.** Промени в болковата перцепция в инсерцията и в инервационната зона на *biceps brachii*, измерени при механична стимулация с палпация и визуално-аналогова скала (ВАС) преди и след (веднага след и след 24-, 48- и 72 часа) ексцентрично натоварване на флексорите на лакътя. \*Статистически значими различия ( $p < 0.05$ ) в сравнение със стойностите на ненаатоварената ръка; □ Статистически значими различия ( $p < 0.05$ ) в сравнение със стойностите преди- или преди- и веднага след натоварване на дясната ръка; Δ - Статистически значими различия ( $p < 0.05$ ) в сравнение със стойностите преди и веднага след натоварване (ANOVA и Tukey post test).

От представените данни за *m. biceps brachii* при приложения от нас модифициран модел за генериране на DOMS, могат да се посочат следните тенденции:

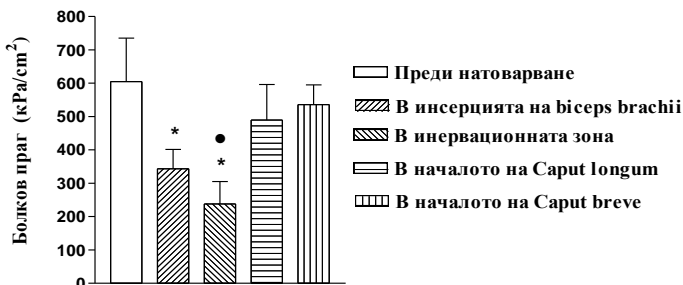
(1) веднага след натоварването болката при палпация в инсерцията и в инервационната зона се повишава, в сравнение с тази на ненатоварената ръка и с усета преди натоварване на двете ръце, но статистически достоверно е повишението само в инервационната зона. Следователно в инсерцията тя е сходна с болковата перцепция преди натоварване и отговаря на определението за забавено начало, тъй като се проявява 24 часа след натоварването;

(2) Изразена хипералгезия, регистрирана при палпация в инсерцията и в инервационната зона ( $p < 0.05$ ), се наблюдава на 24-ия, 48-ия и 72-ия час (Фигура 15) в сравнение с тази преди натоварване на двете ръце, а в областта на инервационната зона тя е повишена и веднага след натоварване. Няма достоверни разлики в хипералгезичните ефекти на 24-ия, 48-ия и 72-ия час, т.е. всички стойности са достоверно по-ниски от стойностите, измерени веднага след натоварването и преди натоварването.

Тези резултати показват, че приложеният модел на DOMS е надежден. Тази динамика е типична за забавено начало на мускулна болезненост, генерирана от ексцентрично натоварване. Хипералгезията има достатъчен интензитет и поне 3 дневна продължителност.

От получените резултати може да се заключи, че: (1) болковият праг, измерен веднага след натоварването, не се различава от този преди натоварването. Следователно базалната ноцицепция не се променя веднага след натоварването, а се „забавя“, което съответства на предполагаемия механизъм за генериране на DOMS; (2) болковите прагове намаляват статистически достоверно ( $p < 0.05$ ) и наблюдаваната хипералгезия, с размер от около  $200 \text{ kPa/cm}^2$ , е манифестирана в целия тридневен период на проследяването на болковите прагове; (3) няма достоверни разлики в хипералгезичните ефекти на 24-ия, 48-ия и 72-ия час, тоест всички стойности са достоверно по-ниски от стойностите измерени веднага след

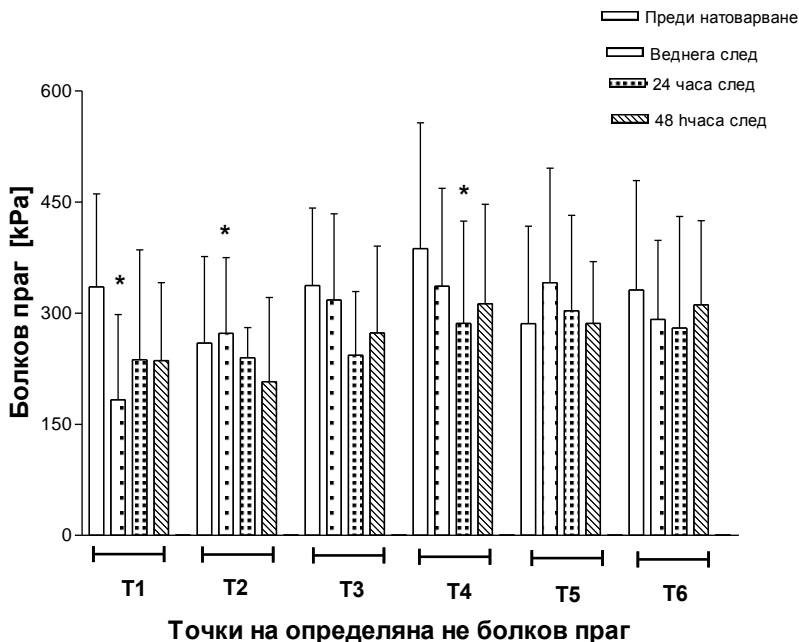
натоварването и/или преди натоварването. Получените резултати показват, че приложеният модел на ексцентрично натоварване генерира DOMS с характерна симптоматика и има продължителност от поне 3 дни.



**Фигура 15.** Хипералгезични ефекти (DOMS), предизвикани с ексцентрично натоварване на флексорите на лакътя с изокинетичен динамометър Biodex и измерени чрез оценка на болкови прагове на 48-ия час след натоварването, с алгометър Somedic в инсерцията, инервационната зона и началото на дългата глава (caput longum) и късата глава (caput breve) на *m. biceps brachii*. Стойностите преди натоварване са осреднени от измервания върху всички измерени места. \*Статистически достоверна разлика в сравнение с осреднения праг преди натоварване. \*Статистически достоверна разлика, в сравнение с всички други измервани зони (ANOVA и Tukey post test).

**Модел с ръчен динамометър на мускул flexor digitorum profundus.** Само един от участниците успя да направи две повторения по 15 min, докато другите участници при първия опит продължителността на натоварването беше  $178.0 \pm 109.5$  sec и  $87.8 \pm 39.7$  sec при втория опит. Всички участници в изследването имаха болка в недоминантната ръка веднага след натоварването, оценена по VAS  $33.0 \pm 25.1$  mm в покой и  $31.3 \pm 16.2$  mm при флексия на показалеца без съпротивление. 24 часа след натоварване, всички изследвани лица имаха болка при флексия на „натоварения“ пръст при VAS =  $10.8 \pm 14.7$  mm, но само 3-ма от тях имаха мускулна болезненост в покой,  $27.7 \pm 24.1$  mm. Освен в засегнатия пръст, мускулна болезненост се наблюдаваше и в палеца, дланта, китката,

предмишницата, мишницата и рамото. Болката беше описана като силна, продължителна, с усещане за тежест. Болковият праг, веднага след физическото усилие, беше значително по-нисък ( $p < 0.01$ ) в недоминантната ръка, 1 cm над medial epicondyle и 1 cm под medial epicondyle (в близост до залавните места на m. flexor digitorum profundus), докато 24 часа след натоварването хипералгезичните промени бяха най-изразени ( $p < 0.01$ ) в областта на „коремчето“ на m. flexor digitorum profundus (Фигура 40).



**Фигура 40.** Стойност на болков праг, определен чрез ръчен алгометър, преди, веднага след натоварване, 24 часа и 48 часа, след натоварване с ръчен динамометър. \*Статистически значима разлика ( $p < 0.05$ ) при сравнение с стойностите преди натоварване (Kruskal-Wallis ANOVA, последвана от Dunns's test). **Точки на определяне на болков праг:** T1 – 1 cm над medial epicondyle на мишничната кост; T 2 – 1 cm под medial epicondyle на мишничната кост; T 3 – латералното "коремче" на m. flexor digitorum profundus; T 4 – медиалното "коремче" на m. flexor digitorum profundus; T 5 – средната част на предмишницата (сухожилията на флексорите на пръстите); T 6 – 1 cm над processus stiloideus radii.

## 5. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

### Хипоалгезични ефекти след физическо натоварване

**Базална ноцицепция.** Стойностите на болковия праг и болковия толеранс, определен върху левия крак, показват статистически достоверна разлика ( $p < 0.05$ ) спрямо тези при десния, т.е. доминантният крак (десния), който е по-малко чувствителен на болка. Подобна зависимост е доказана при прилагане на други изследователски техники (Polianskis et al., 2001), като се предполага, че това е адаптационен механизъм за повишаване на издръжливостта и трениране на по-натоварения крайник или по-често упражнявания.

Нещо повече, нашите резултати показват също така, че латералната глава на GS има по-високи стойности на болковия праг. Трудно обаче може да се направи извод, че именно тя е по-натоварена при ходене и друга физическа активност, тъй като в литературата съществуват противоречиви данни за активността на двете глави на прасцевия мускул при ходене и/или спортни занимания. Polianskis et al. (2001) показват също по-ниски стойности на болковия праг за латералната глава на мускула, като обяснява това със структурните особености и разположението на *p. sural cutaneous lateralis*. Тези различия могат да се дължат, също така, и на различната позиция на подбедрицата при определянето на болковите прагове, което ще доведе до различна активност на двете глави, което от своя страна да повлияе чувствителността на мускулната тъкан, или пък на структурни особености и в частност на това, че латералната глава е по-малка и по-плътна „лежи“ върху костите, т.е. осигурява се потвърда „опора“ при определяне на прага. Това до някъде. Това в някаква степен се потвърждава и от значително високите стойности на болковия праг на периосталната повърхност на *tibia*-та, установени при нашите изследвания.

Определянето на болкови прагове върху "коремчето" на *m. biceps brachii* на лявата и дясната ръка в покой, не показва разлики между двете ръце, като резултатите са сходни с тези получени от

Schaffner et al. (2008), които прилагат топлинен алгогенен дразнител. Тези резултати могат да се дължат на приблизително еднаквата натовареност на двете мишници, а ако има различие в механичните болкови прагове при ръцете, то вероятно би било по-изразено върху дланите. Според Schaffner et al. (2008), обаче, разликата в болковия усет между двете ръце може да е индикация за предразположение към полиневропатия. Друго възможно предположение е, че праговете на двете ръце имат сравнително еднакви стойности, но толерансът към болковия стимул (не е определян в настоящето изследване) е различен в зависимост от доминантността (Pud et al., 2009), т.е. доминантният крайник има по-голяма толерантност към болка, защото е по-упражняван.

**Ноцицепция след физическо натоварване.** Резултатите от нашите изследвания показват, че максималния тест индуцира промяна в болковата перцепция, която е свързана с повишени нива на болковия праг и болковия толеранс и понижени стойности на болковия рейтинг. Тези резултати са сходни с литературни данни от натоварвани със субмаксимален и максимален характер (Drury et al., 2005), т.е. натоварвания с интензивност между 65 и 80% от максималната кислородна консумация.

Механизмите, отговорни за тази ХИФН, обаче остават дискуссионни. Някои автори предполагат, че усилената проприорецептивната аферентация „задръства“ и пречи на ноцицептивната аферентация и това е причина за настъпващото „обезболяване“ (Hoffman et al., 2004). Според други автори, причина за ХИФН е повишаване в стойностите на артериалното кръвно налягане, тъй като има изследвания, които доказват, връзка между модулация в ноцицепцията и сърдечно-съдовата система (Kotlyn et al. 2006). В нашите изследвания не проследяваме тази корелация, но и не потвърждаваме връзката между промените в болковите параметри и повишените стойности на кръвното налягане, тъй като болков праг, болков рейтинг и болков толеранс, са определяни 15 min след натоварване, при нормализиране на сърдечно - съдовите показатели.

Друг механизъм, който може би участва пряко в модулацията на болковата перцепция е освобождаването на различни невромодулатори и хормони по време на натоварването, така например - катехоламини, соматотропен хормон, АКТХ и глюкокортикоиди, а също така и участието на изследваните от нас опиоидна и канабиноидна системи.

Нашите експериментални резултати и литературните данни предполагат, че вероятно аналгезията при физическо натоварване се опосредства предимно от усилената проприорецептивна афрентация и совобождаването на ендогенни опиоиди и канабиноиди, които вероятно участват и в моделирето на мускулната сила. В сходство с тази теза са данните на Henriksen et al. (2013), които установяват „повсеместна” хипоалгезия (засяга цялото), но тя е най-изразена в активно работещата мускулатура.

**Корелация между нивото на хипоалгезия и изокинетична мускулна сила.** Мускулната сила е показател не само за състоянието на мускулите/мускулните групи, но и отразява функционалните възможности на цялото тяло. Тъй като тя може да бъде модулирана от различни ендогенни системи, за някои от тях се смята, че участват в модулация на болковата перцепция. В литературата основно се изследва промяната в нейните стойност при модели на хипералгезия и/или при различни мускулно-скелетни заболявания (фибромиалгия и остеоартрит).

Установихме, че няма корелация между размера на хипоалгезията и силата на дорзалните флексори на ходилото на същия крак, но съществува умерена корелация между степента на ХИФН в латералната глава на GS и силата на плантарните флексори на ходилото. Силно изразена е връзката между хипоалгезичните промени и силата на флексорите на коляното, а при екстензорите корелацията е незначителна. Вероятно, колкото по-голяма е силата на даден мускул/мускулна група, толкова хипоалгезичните промени са по-изразени. Henriksen et al. (2013) също установяват, че по-малката болкова чувствителност е свързана с по-голяма изометрична сила. Тъй като не е доказана подобна корелация при действието на

химичен алгогенен дразнител се предполага, че при здрави лица мускулните функции се свързани предимно с чувствителността към механични стимули. Литературните данни и тези от нашето изследване предполагат, че налягане с по-голяма стойност води до същите интрамускулни биомеханични деформации, като тези при мускули, осъществяващи мощно съкращение, в сравнение с тези с по-малки съкратителни възможности (Finocchietti et al., 2011).

Вероятно, при системно трениращите/спортуващи хора регулярното активиране на ендогенната опиоидна и канабиноидна система води до адаптационни изменения, вероятно на централно и/или периферно, които променят базалната ноцицепция. Това води до по-манифестирана хипоалгезия при натоварване, по-голяма издръжливост и модулация на централния драйв от моторната кора, а това предизвиква генериране на по-голяма мускулната сила.

**Сравнение на хипоалгезични промени между тренирани и нетренирани.** Данните от нашите изследвания показват, че болковият рейтинг е по-нисък при танцьорите ( $p < 0.05$ ) в сравнение с нетренираните, т.е. тренираните имат нисък праг на болковата чувствителност в сравнение с нетренираните.

Танцьорите имаха, също така, по-високи стойности на силната поносима и непоносима болка (болков толеранс), както в покой, така и след натоварването, но разлика между болковите прагове на двете изследвани групи, преди и след физическото усилие, не беше установена. Данните са сходни с тези получени от Wetterslev et al. (2008), които доказват, че стойностите на болковия праг на тези при спортисти и при нетренирани се характеризират с голяма вариабилност и не може да бъде потвърдено, че именно тренираните лица имат по-високи стойности на болков праг от нетренираните. Болковият толеранс, обаче, при тренирани (танцьори) е значително по-голям. Тези различия, вероятно се дължи на факта, че оценката на болковия праг е доста субективна и по-скоро зависи от генетични фактори, докато толерансът може да бъде модулиран от различни психо-физиологични и психични фактори (Quiton & Greenspan, 2008). От друга страна, атлетите и професионалните танцьори са

изложени на постоянни/ежедневни дискомфортни сетивни преживявания, които обуславят високата физическа и психологическа устойчивост на системно трениращите.

Възможна хипотеза, която може да обясни механизмите на антиноцицептивна модулация при системно трениращи, което потенциира повишения болков толеранс, е свързана с повишено освобождаване на ендогенни канабиноиди (Galdino et al., 2014) и опиоиди (Пенчева и Божкова, 2004) в резултат на ФН. Установено е, увеличена експресията на CB1 рецептори както при системно тренирани (Hill et al., 2010), така и след еднократно физическо натоварване (Galdino et. al., 2014). В допълнение на това, повишена експресия а CB1 рецептори се наблюдава и в дорзолатералната и ветролатералната зона на PAG, която пък участва в модулацията на болковата перцепция. Съществува вероятност CB2 рецепторите също да участват в модулацията на ХИФН на периферно ниво (Guindon et al., 2011).

Противоречиви са данните относно системно повишени нива на бета-ендорфин при тренирани (Kapasi et al., 2001). Някои автори докладват за повишени нива в покой на бета - ендорфина при лица с повишена двигателна активност, а според други няма разлика в бета-ендорфиновите нива при спортисти (Lobstein & Rasmussen, 1991).

Литературните данни до този момент и резултатите от нашите изследвания, дават основание да предположим, че ЕОС и повишеното освобождаване на опиоиди след ФН е по-скоро механизъм, участващ в моделирането на болковия праг, т.е. базална ноцицепция, а също и промяната след физическо натоварване. Докато вероятно, активирането на ЕКС, обуславя повишените стойности на болковия толеранс при танцьорите/нетренирани, т.е. ЕК медиират болкова издръжливост, поради техните доказани психогенни ефекти и възможността им да преминават кръвно – мозъчната бариера поради липидната си природа.

## **Опиоидна и канабиноидна модулация на ноцицепцията при стрес-индуцирани реакции – имобилизация и плуване**

Paul et al. (2002) отбелязват, острият имобилизационен стрес води до силно изразена стрес-индуцирана антиноцицепция, като резултатите от нашите експериментални серии показват, че РР-прагът и НР-латентността се увеличават след стрес със 75.1% и 38.8%, съответно. По-добре изразена е опиоидната модулация при действие и на двата болкови дразнителя, но по-значително е понижението в болковите параметри при едновременното въвеждане на опиоиден и канабиноиден рецепторен антагонист и прилагане на механичен дразнител. Налице е, добре изразен синергичен ефект между двете модулиращи болката системи, като тези данни са сходни с резултати на Butler & Finn (2009). Трябва да отбележим, че към днешна дата литературни данни са оскъдни относно взаимодействието на двете системи при имобилизационен стрес.

Множеството изследвания върху хора и животни предполагат, че основно ендорфините и енкефалините медиират СИА, като бета - ендорфинът опосредства промените в болковия праг, а енкефалините медиират болковия толеранс. Данните от нашето изследване предполагат участието опиоидни рецептори в опосредстването на СИА, което съвпада с резултатите на Watkins et al. (1993). Както е известно активирането на опиоидните рецептори води до промени в синтеза на ГАМК/глутамат в редица невронални структури, които са част от десцендентната болкова система, като PAG, RVM, таламус, амигдала и гръбначен мозък.

Данните от хроничния имобилизационен стрес показаха по-голямо участие на ЕКС при модулацията на аналгезия в сравнение с ЕОС, както при тестване с *hot plate test*, така и при *paw pressure test*. Предполага се, че именно концентрацията на канабиноиди регулира секрецията на АКТХ по време на стрес. Тъй като при хроничния стрес синтезата на 2-AG е по-висока, а нивото на АКТХ е понижено и раздразнителността е по-малка, т.е. налице е постепенна адаптация към новите условия на средата и постепенното намаляване

степената на СИА. Някои автори показват, че ЕК участват в базалната регулация на хипоталамо-хипофизно-адреналната ос която е ключова при стрес и натоварване (Cota et al., 2007).

Добре изразената антиноцицептивна модулация след хроничен имобилизационен стрес при действие на термичен аллогенен стимул, вероятно се дължи на повишение в нивата на другия подробно изучен ЕК - анандамид, за който е известно, че при по-високи стойности на концентрациите му може да взаимодейства и с TRPV1 рецептора, който пък от своя страна активира канабиноидните рецептори. Това предполага, че между тези два вида рецептори има функционална връзка, още повече като се вземе предвид и експресията им върху едни и същи клетки на спинално и супраспинално ниво (Ross, 2003).

От нашите резултатите и литературните данни може да се предположи, че канабиноидната система освен в потенциране на адаптацията към действието на даден стресор, вероятно участва и в модулацията на болковата перцепция на супраспинално ниво при продължителна имобилизация. На спинално ниво засега се предполага, че канабиноидната система медура ноцицептивната модулация (Butler & Finn, 2009). Синергичният ефект на двете модулиращи болката системи е факт и след четиридневния имобилизационен стрес, като и тук по-силно изразено е действието на механичен аллогенен стимул.

**Имунохистохимично изследване на плътността на СВ 1 рецептори.** Резултатите от имунохистохимичното изследване показват, специфично разположени СВ1-имунореактивни неврони в отделните слоеве на медиалния PFC при интактни животни и при тези изложени на остър имобилизационен стрес. Тяхната гъстота е по-голяма в дълбоките слоеве на кората, като се експресират върху сомата, дендритите и аксоните на коровите неврони, но по-силно изразена е ( $p < 0.05$ ) плътността им след стресът. Получените резултати ни дават основание да предположим, че префронталния кортекс участва индиректно при промяната в болковата перцепция след остър

имобилизационен стрес, или постстресовото увеличение на СВ1 рецепторите се дължи на взаимодействието им с ендогенната опиоидна система, която медира освобождаването на опиоидни пептиди. Друго възможно обяснение е, че тази част от кората, тъй като участва предимно при формиране на психичната компонента на болковия усет (Seifert & Maihöfner, 2009) и увеличеният брой СВ1 рецептори вероятно, се дължи на това, че те участват при формиране на болковия толеранс и /или адаптационните промени в организма предимно след стрес.

**Физическо натоварване – плуване.** Резултатите от нашите експерименти са сходни с тези на Parikh et al. (2011), които показват изразена аналгезия след плуване. Те подчертават, че най-голямо е повишението на болковите стойности на 5 min след натоварването, след което те постепенно намаляват. Данните от нашите експерименти, показват постепенно „*отшумяване*“ на „*обезболяването*“ до 30 min след стреса. Литературните данни и нашите резултати ни дават основание да предположиме, че опиоидната компонента на супраспинално ниво е по-изявена при тази форма на СИА - 15 минутно плуване в топла вода, докато участието на отделните ендогенни опиоиди е дискуссионно.

Резултатите от десетдневното плуване показват, че болковата перцепция при механичен стимул се опосредства в по-голямата си част от ендогенните опиоиди, докато при действие на топлинен дразнител канабиноидната модуляция е по-силно изразена. Въпреки, че стойностите на НР-латентността не се промениха съществено след хроничното плуване при инжектиране на СВ1 рецепторен блокер, НР-латентността бе значително понижена. Това вероятно, се дължи на повишената концентрация на анандамид след хроничното плуване и взаимодействието му с TRPV1 рецептор (Cristino et al., 2006). Вероятно е, и 2-AG да опосредства аналгезията на супраспинално ниво, поради неговия по-силен антиноцицептивен ефект (Guindon et al., 2007), докато повишените концентрации на анандамид е по-вероятно

да са свързани с терморегулаторни механизми при натоварване и изобщо стресови състояния.

**Взаимодействие между ендоканабиноидна и ендоопиоидна система.** Резултатите от нашите изследвания показват взаимодействието на ЕКС и ЕОС, както при острите, така и при хроничните модели на СИА, а също така и при двата вида стресори – имобилизация и физическо натоварване.

Добре известно е, че и двата типа рецептори са разположени пресинаптично и обикновено при активирането си потискат освобождаването на дадени невротрансмитери (Schlicker & Kathmann, 2001). Известно е също, че те са ко-локализирани в структури като задните рога на гръбначния мозък, путамен, дорзалния хипокамп, субстанция nigra и в структурни части от десцендентната инхибиторната ноцицептивна система и такива, участващи в невроендокринните ефекти – PAG, nucleus raphe magnus, централното медиално таламично ядро и медиалната част на хипоталамуса (Romero et al., 1998). Установено е, че опиоидите и канабиноидите се свързват с различни рецептори, но и двата вида представляват G-куплирани белтъци и тъй като е известно, че това са различни G-протеини, вероятното взаимодействие се дължи на припокриване на двата каскадни процеса на ниво синтез на цикличен аденозин монофосфат (Massi et al., 2003). Друга възможна хипотеза за синергичния ефект на двете модулиращи болката системи е възможността за взаимодействие на пострецепторно ниво, тъй като имат сходен вътреклетъчен сигнален механизъм. Така че при различни степени на активация на рецепторите, може да настъпят промени в клетъчната трансдукцията и да се създаде възможност за „cross“-толерантност и взаимно потенциране на ЕКС и ЕОС.

Нашата хипотеза, подобно на тази на Gonzalez et al. (2003) е, че вероятно канабиноидно-опиоидният синергизъм се дължи на активирането на CB1 рецептори, което пък от своя страна, вероятно повишава нивата на опиоидни пептиди и така се повлияват  $\mu$ -опиоидните или  $\kappa$ -опиоидните рецептори в мезолимбичната област

(Ghozland et al., 2002; Walentiny et al., 2010), което повишава допаминергичната активност.

## **Хипералгезия при модели на DOMS**

Най-често DOMS се наблюдава след стречинг упражнения, плиометрична тренировка или натоварвания с преобладаващи ексцентрични мускулни съкращения (Nelson, 2013), като болковата симптоматика започва 12-24 часа след физическото усилие и може да продължи до 10 дни.

Данни за разработения от нас стандартизиран модел на DOMS чрез изокинетичен динамометър, показват добре изразено „забавено начало на мускулна болезненост“. В този случай хипералгезията има достатъчен интензитет и поне триденевна продължителност. Времето за достигане на максимален торг не се променя, от което следва, че натоварването не води до умора, което се подчертава и от други автори (LaStayo et al., 2003). По отношение на локализацията на болката след ексцентрично натоварване, установихме, че хипералгезията е максимална в инервационната зона и в инсерцията на *m. biceps brachii*. Подобна локализация на болковите промени се установява и от други автори (Proske & Allen, 2005). Не е ясна обаче, природата на въздействие върху инервационната зона, т.е. върху моторната плочка. Предполагаме, че понижението в болковия праг в инервационната зона при ексцентрични съкращения, вероятно се дължи на преразтягането на „напречните“ мостчета при образуването на акто-миозиновия комплекс по време на ексцентричните мускулни съкращения.

Подобни са резултатите и след ексцентричните мускулни съкращения с ръчен динамометър, където понижението на болковия праг 24 часа след натоварването беше най-голямо в областта на инервационната зона. Това може да бъде разглеждано и като защитен механизъм, който повлиява функционалното състояние на мускула, а оттук и намалената мускулна сила след преобладаващи ексцентрични съкращения (Zainuddin et al., 2005).

## 6. ИЗВОДИ

1. Установена е изразена хипоалгезия при физическо натоварване при здрави нетренирани мъже. Болковите прагове се повишават с  $19.79 \pm 2.40$  %, а болковият толеранс  $46.93 \pm 3.94$  %.
2. Латералната глава на *m. gastrocnemius* – *m. soleus* има по-висок болков праг от медиалната преди и след физическо натоварване. Болковите прагове на доминантния крак имат по-високи стойности в сравнение с тези на недоминантния. Повишението на ноцицептивния праг е по-силно изразено в работещата мускулатура, а отделните области на мускула имат различна болкова чувствителност.
3. Няма разлика в болковите прагове на системно трениращи и нетренирани, но трениращите имат по-високи стойности на болковия толеранс, в сравнение с нетренираните, както преди, така и след натоварване, като толерансът е по-висок с  $22.8 \pm 4.9$  % и  $\geq 34.6 \pm 5.8$  %, съответно.
4. Съществува добре изразена корелация между степента на хипоалгезични промени след натоварване и мускулната сила, т.е. при по-голяма мускулна сила степента на аналгезия е по-голяма.
5. Разработен е стандартизиран модел за генериране на DOMS на флексорите на лакътя, който е характерен като хипералгезична болкова симптоматика, който не води до умора по време на натоварването и има достатъчна продължителност от 72 часа.
6. Създаден е модел на DOMS с ръчен динамометър на единичен мускул (*m. flexor digitorum profundus*).
7. Индуцираната аналгезия при остра имобилизация вероятно се опосредства предимно от ендоенкефалинната система, докато аналгезията след хронична имобилизация, предимно от ендоканабиноидната система. По-добре изразена е ноцицептивната модулация при действието на механичен алгогенен стимул, в сравнение с термичен стимул.

8. При физическо натоварване чрез плуване, антиноцицептивните ефекти се обуславят от активиране на ендоендорфинната и ендоканабиноидната система.
9. Опиоидите участват в по-голяма степен в модулирането на базалната ноцицепция при експериментални животни и вероятно опосредстват промените в болковия праг след стрес. Ендоканабиноидната система потенцирана освобождаването на опиоиди и/или медиатора промените в болковия толеранс.
10. Между ендоендорфинната и ендоканабиноидната система има добре изразен синергичен ефект и/или взаимодействие, както при модулация на механични и термични стимули, така и при остър и хроничен стрес.

## 7. ПРИНОСИ

1. Представени са убедителни данни за статистически достоверна хипоалагезия при различни модели на физическо натоварване и за нейните специфични аспекти при сравнително проследяване на: - натоварени и ненаатоварени мускулни групи; - доминантен и недоминантен крайник; - ниво на тренираност; - базална ноцицепция.
2. Внедрени са и са охарактеризирани разнообразни техники за оценка на експериментална болка при хора и е анализирана тяхната приложимост в зависимост от целите на изследванията върху болков праг и болков толеранс, включително такива, свързани с физическо натоварване.
3. Представени са експериментални доказателства за синергичен ефект и диференцирана модулация на антиноцицепцията от ендогенната опиоидна и ендогенната канабиноидна система при остър и при хроничен стрес с имобилизация и при остър и хроничен стрес с физическо натоварване. Опиоидната антиноцицептивна модулация е по-добре изразена при остър стрес, докато канабиноидната – при хроничен стрес.
4. Представени са експериментални доказателства за корелации между хипоалагезията, индуцирана при физическо натоварване в *m. gastrocnemius* и мускулната сила на плантарните флексори на глезена и на флексорите и екстензорите на коляното. Те допринасят за генериране на иновативна хипотеза за трайна модулация на моторния драйв към периферните моторни неврони от ендогенната опиоидна система, което корелира с механизми на умората, болката и издръжливостта при скелетно - мускулната работа.
5. Разработен е стандартизиран модел на DOMS с изокинетична динамометрия на група мускули (флексори на лакътя) и модел на DOMS при единичен мускул (*m. flexor digitorum profundus*). Стандартизирания модел може да се прилага при изследвания върху подходи за преодоляване на DOMS.

## 8. БИБЛИОГРАФИЯ

- Пенчева Н., Божкова Л. (2004). Спорт и наука, 2, 101 – 112.
- Butler R.K. Finn D.P. (2009). Prog Neurobiol, 88 (3), 184-202.
- Cota D. (2008). Journal of Neuroendocrinology, 20 (1), 35 – 38.
- Cristino L. et al. (2006). Neuroscience, 139, 1405-1415.
- Drury D.G. et al. (2005). Journal of Sports Science and Medicine, 4, 215-222.
- Finocchietti S. et al. (2011). Clinical Journal of Pain, 27(5), 414-424.
- Galdino G. et al. (2014). Neuropharmacology, 77, 313-324.
- Gonzalez S. et al. (2003). Addict Biol, 8(2), 159-166.
- Guindon J., Desroches J., Beaulieu P. (2007). British Journal of Pharmacology, 150(6), 693-701.
- Guindon J. et al. (2011). Br. J. Pharmacol., 163, 1464-1478.
- Henriksen M. et al. (2013). Pain Research and Treatment, 1, 1-7.
- Hoffman, M., Shepanski, M., Ruble, S., Valic, Z., Buckwater, J., Clifford, P. (2004). Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, 85, 1183-1187.
- Hill M. N. et al. (2010). Journal of Neuroscience, 10, 30(45), 14980 –14986.
- Hoffmann P., Thoren P. (1988). Acta Physiol Scand, 133, 211-219.
- Kapasi Z.F. et al. (2001). Physical Therapy November, 81 (11), 1801-1809.
- Koptyn K. F., Umeda M. (2006). Sports Medicine, 36(3), 207-214.
- Lastayo P.C. et al. (2003). J orthop Sports Phys Ther, 33, 557-571.
- Lobstein D.D., Rasmussen C.L. (1991). J Sports Med Phys Fitness, 31, 543-55.
- Massi P. et al. (2003). J Neuroimmunol, 145(1-2), 46- 54.
- Nelson N. (2013). Journal of Bodywork & Movement Therapies, 17, 475-482.
- Parikh D. et al. (2011). European Journal of Pharmacology, 160 (2-3), 563–567
- Paul V.N., Chopra K., Kulkarni.S.K. (2002). Methods Find Exp Clin Pharmacol, 24 (7), 413-419.
- Polianskis R., Graven-Nielsen T., Arendt-Nielsen L. (2001). European Journal of Pain, 5, 267-277.
- Proske, U., Allen, T. (2005). Exercise and Sport Sciences Reviews 33, 98-104.
- Pud D., Golan Y., Pesta R. (2009). Neuroscience Letters, 467, 237-244.
- Quiton R.L., Greenspan J.D. (2008). Pain, 137, 245-56.
- Randall L., Selitto J.J. (1957). Arch Int Pharmacodyn Ther., 111(4), 409-419.
- Ross R.A. (2003). Br. J. Pharmacol., 140, 790-801.
- Romero J. et al. (1998). Synapse 3, 298–308
- Schaffner N. et al. (2008). Neuroscience Letters, 440(3), 309-313.
- Seifert F., Maihöfner C. (2009). Cell Mol Life Sci 66, 375–390.
- Stoilov A. et al. (2009). Proceedings of the Third International Scientific Conference, 1, 92-97.
- Walentiny D.M. et al. (2010). Psychopharmacology, DOI 10.1007/s00213-010-1827-6
- Watkins L.R., Wiertelak E.P., Maier S.F. (1993). Behav. Neurosci, 107, 402-405.
- Wetterslev J., Thorlund K., Brok J., Gluud C. (2008). J Clin Epidemiol, 61, 64-75.
- Zainuddin Z. et al. (2005). J Athl Train., 40(3), 174–180.
- Zimmermann M. (1983). Pain, 16, 109-110.

## **9. СПИСЪК НА ПРОЕКТИ, ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИРЕКТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **1. Участие в научно-изследователски проекти:**

1.1. „Промени в алкално-киселинната хомеостаза и някои олигоелементи при упражнения за скоростна издръжливост“, тригодишен (2006-2009), Фонд „Научни изследвания“ – МОН, шифър: ВУ-Б-11/05.

1.2. „Внедряване на компютъризиран метод за измерване на болка при дразнене на дълбоки механорецептори и тестването му при здрави (тренирани и нетренирани) и при пациенти“, тригодишен проект (2008-2010); Университетски проект №: НИД-Н9/Д-72008-2010.

1.3. „Изграждане и пробация на научен комплекс за оценка на физиологични и биомеханични параметри при физическо натоварване за нуждите на кинезитерапията и спорта“, двугодишен (2008-2010), Фонд „Научни изследвания“ – МОН, № на проекта: RNF 01/0116, № на договора: ДОО2 – 54/10.12.2008.

1.4. „Биоинформатични изследвания върху структурата и активността на протеини и лекарствено-рецепторни взаимодействия“, двугодишен (2009-2011), Фонд „Научни изследвания“ – МОН. шифър: DVU 01/197.

1.5. „Лабораторен модул за обучение на студенти по анатомия, функционална анатомия, патоанатомия, ортотика и протезиране“, Целеви университетски, № на проекта: НИД-Н9/Ц-2 (2009).

1.6. Проект BG051PO001-3.3.05-0001 - „Наука и бизнес“, обучение на докторанти в европейски центрове и лаборатории. Едномесечно обучение в Pain Research Centre, с ръководител Prof. Mark I. Johnson,

Leeds Metropolitan University, UK; октомври-ноември 2013 година.  
ДО2-798/23.09.2013 (МУ-12-14/2013).

1.7. Youth Mobilization – Cultural Heritage and Athletic Valorization (YMC(H)A), European Territorial Cooperation Programme „Greece-Bulgaria“ 2007-2013, FUNCTIONAL STUDIES IN SPORTS AND KINESITHERAPY.

## 2. Учебници /Пособия

Пенчева Н., **Грънчарска К.** (2007) Физиология на човека и физиология на спорта: Тестове с избираеми и свободни отговори. Част I: нервно-мускулна физиология, сетивност, моторика, вегетативни функции и висша нервна дейност. Университетско издателство „Неофит Рилски“ – Благоевград.

## 3. Публикации

3.1. Pencheva N., **Grancharska K.**, Bocheva A., Dzambazova E., Landzhov B., Malinova L., Bozhilova Pastirova A., Ovtscharoff W. (2012). Immunocytochemical study of CB1 receptors in rat's prefrontal cortex after immobilization stress. Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci., 65(7), 1003-1008. (IF: 0.211) ISSN: 1310-1331.

3.2. Пенчева Н., Кокова М., **Грънчарска К.**, Манчев А. (2012). Кинезиологични изследвания чрез регистрация на ЕМГ активност и измерване на силови параметри, Спорт и наука, 5, 319 – 333.

3.3. Пенчева Н., **Грънчарска К.**, Стоилов А. (2010). Оценка на дълбока тъканна болка преди и след натоварване при здрави хора, Спорт и наука (извънреден брой, част първа, Спорт, стрес, адаптация), 358-363.

3.4. Stoilov A., Pencheva N., Trenchev Iv., **Grancharska K.**, (2009). Stimulus – response relations of deep tissue pain obtained with computer-controlled pressure algometry, Proceedings of the Third International Scientific Conference – 3-7 June 2009, South-West University “Neofit Rilski” Blagoevgrad, 1, 92-97.

3.5. Pencheva, N., **Grancharska K.**, Kadiisky I., Genova M. (2008). Blood gases and acid-base state before- and after graded dynamic exercise. Scientific Research Journal of SWU (Proceedings of the IX-th National Congress of the Bulgarian Society of Physiological Sciences), 1(1), 57 - 61.

3.6. Pencheva, N., **Grancharska K.**, Nikolova E., Kotcev Ch. (2008). Experimental pain measurement in different exercise models. Scientific Research Journal of SWU (Proceedings of the IX-th National Congress of the Bulgarian Society of Physiological Sciences), 1 (1), 51-56.

3.7. Pencheva N., **Grancharska K.**, Kossev A. (2007). Methods for assessment of the specific pain symptoms after eccentric muscle contractions. (Proceedings of I Balkan Scientific Conference, The Science, the Education and the Art in 21<sup>st</sup> Century), 1 (1), 88-94.

#### **4. Участия в научни срещи с абстракт**

4.1. **Grancharska, K.**, Pencheva, N. (2013). Comparison of methods for assessment of exercise-induced mechanical hypoalgesia, 18<sup>th</sup> annual Congress of the European College of Sport Science, Barcelona – Spain, 26-29 June 2013, 638.

4.2. Pencheva N., Stoilov A., **Grancharska K.** (2011). Crosstalk between the exercise-induced mechanical hypoalgesia and isokinetic muscle strength, 16<sup>th</sup> annual Congress of the European College of Sport Science, Liverpool, UK, 06– 09 July 2011, 516.

4.3. **Grancharska K.**, Pencheva N., Stoilov A., Kotzev C. (2010). Changes in pain perception after graded cycling exercise in untrained, 15<sup>th</sup> Annual ECSS-Congress, 23-25 June 2010, Antalya, Turkey.

4.4. Pencheva N., **Grancharska K.**, Bocheva A., Dzhambazova E. (2010). Cannabinoid and opioid anti-nociceptive modulation of mechanical and thermal stimuli after limited motor activity, 15<sup>th</sup> Annual ECSS-Congress, 23-25 June 2010, Antalya, Turkey.

4.5. **Grancharska K.**, Pencheva, N. (2009). Pain threshold and pain tolerance in dancers, European Journal of pain, Abstracts of Pain in Europe VI (6<sup>th</sup> Congress of the European Federation of IASP<sup>®</sup> Chapters (EFIC), 9-12 September 2009, Lisbon, Portugal, 926, 262.

4.6. **Grancharska K.**, Pencheva N., Nikolova E., Kotchev Ch. (2006). Impact of an incremental exercise on the pain. European College of Sport Science, 11<sup>th</sup> Annual Congress, July 08-11, 2006, Lausanne, Switzerland, PP3-01-88, 517-518.

4.7. Pencheva N., Mladenova A., Tzatchev K., Genova M., **Grancharska K.** (2006). Effect of maximal exercise on haemorheological parameters in trained and untrained males. 14<sup>th</sup> Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation, 27-30 September 2006, Sofia, PP-F-015, 121-122.

## 5. Членство в научни организации:

1. Българско дружество по физиологични науки, клон София.
2. Британско дружество по болка (British Pain Society).
3. Европейска колегия по спортни науки (European College of Sport Science) – ECSS.