МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

Медицински факултет

Катедра по патофизиология

Д-р Христина Христова Ночева-Димитрова

ЕФЕКТИ НА ПЕПТИДИ ОТ СЕМЕЙСТВОТО НА TYR-MIF-1 ВЪРХУ КАНАБИНОИДНАТА СИСТЕМА ПРИ СТРЕС-ИНДУЦИРАНА АНАЛГЕЗИЯ

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

Научен ръководител: проф. д-р Адриана Бочева, дм

София, 2013 г.

- ***Изказвам своята най-искрена и дълбока благодарност на научния ми ръководител проф. д-р Адриана Бочева за помощта и подкрепата при разработването и оформянето на настоящия дисертационен труд, както и за съветите, конструктивната критика и търпението, без които този труд ни би бил възможен.***

- ***Изказвам благодарност и на всички колеги от Катедрата по патофизиология за подкрепата им по време на разработването на настоящата дисертация.***

- ***Изказвам благодарност на проф. д-р Анастасия Божилова и доц. д-р Бойчо Ланджов от Катедрата по анатомия и хистология на МУ – София, за съдействието им при извършване на хистохимичните изследвания.***

СЪДЪРЖАНИЕ

СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА ……....…….. **стр. 7**

ВЪВЕДЕНИЕ .....…….…….....….....….. **стр. 9**

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР …….…….....….. **стр. 11**

1. **Канабиноиди и ендоканабиноидна система** ..... стр. 11
   1.1. Исторически преглед ..... стр. 11
   1.2. Канабиноидни рецептори .....…. стр. 14
   1.3. Предаване на сигнала ..... ……...….. стр. 17
   1.4. Ендогенни канабиноиди ..... стр. 18
   1.4.1. Синтез на ендогенните канабиноиди ..... стр. 20
   1.4.2. Освобождаване и клетъчно захващане ..... стр. 21
   1.4.3. Ретроградно сигнализиране ендогенните канабиноиди ..... стр. 21
   1.4.4. Прекратяване на ендоканабиноидния сигнал ..... стр. 23
   1.4.4.1. Прекратяване на ендоканабиноидната активност посредством високоафинитетен транспорт ..... стр. 23
   1.4.4.2. Метаболитно разграждане на АЕА чрез мастнокисела амид-хидролаза ..... стр. 24
   1.4.5. Измерване на ендогенни канабиноиди .....……. стр. 25
   1.4 6. Терапевтични възможности и индикации на ендогенните канабиноиди……....……..….. стр. 27
2. **Опиоиди и ендогенна опиоидна система** ..... стр. 30
3. **Стрес-индуцирана аналгезия** ..... стр. 41

3.1. Същност ..... стр. 41
3.2. Еволюционно развитие и генетична основа на СИА ..... стр. 41
3.3. Модели на стрес-индуцирана аналгезия ..... стр. 42
3.3.1. Безусловно-рефлекторна СИА ..... стр. 43
3.3.2. Условно-рефлекторна СИА ……..…….....…… стр. 43
3.4. Зависимост на СИА от физиологични фактори (пол, възраст) и от модела на изследване .....…..... стр. 43
3.5. Дифузен инхибиторен контрол на болката (ДИКБ) ….....… стр. 45

3.6. Участие на специфични мозъчни структури в СИА …..... стр. 47
3.6.1. Мозъчна кора ..... стр. 47
3.6.2. Хипокамп ..... стр. 48
3.6.3. Амигдала ..... стр. 49
3.6.4. Periaqueductal grey (PAG)..... стр. 50
3.6.5. Хипоталамус ..... стр. 50
3.6.6. Мозъчен ствол ..... стр. 51
3.6.7. Гръбначен мозък ..... стр. 52
3.7. Неврохимизъм на СИА ..... стр. 52
3.7.1. Медиация и модулация на СИА чрез опиоидната система ..... стр. 53
3.7.2. Модулация на СИА чрез ендоканабиноидната система ..... стр. 55

4. Взаимодействие между ендоканабиноидната и опиоидергичната системи при СИА ..... стр. 57

ИЗВОДИ ОТ ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР ..... **стр. 60**

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ ……..... **стр. 61**

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ ..... **стр. 57**

РЕЗУЛТАТИ ..... **стр. 62**

1. Базална ноцицепция при контролни животни и след стрес ..... стр. 68
1.1. Изследване на базалната ноцицепция при контролни животни ..... стр. 68
1.2. Изследване на базалната ноцицепция при животни след едночасов имобилизационен стрес ..... стр. 68
1.3. Изследване на базалната ноцицепция при животни след едночасов студов стрес ..... стр. 68
2. Изучаване ефектите на анандамида и AM251 върху базалната ноцицепция при контролни животни и след стрес ..... стр. 69
2.1. Изследване на базалната ноцицепция при интактни животни след инжектиране с анандамид или AM251 ..... стр. 69
2.1.1. Изследване на базалната ноцицепция при интактни животни след инжектиране с анандамид ..... стр. 69

2.1.2. Изследване на базалната ноцицепция при интактни животни
след инжектиране с AM251 ..... стр. 70
2.2. Изследване ефекта на анандамида върху едночасова имобилизационна
стрес-индуцирана аналгезия ..... стр. 72
2.3. Изследване ефекта на анадамида върху едночасова студова стрес-
индуцирана аналгезия ..... стр. 72
2.4. Изследване ефекта на AM251 след едночасова имобилизационна
стрес-индуцирана аналгезия ..... стр. 74
2.5. Изследване ефектите на AM251 след едночасова студова стрес
индуцирана аналгезия …..……. стр. 74

3. Изучаване ефектите на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 - MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-К-MIF-1, върху канабиноидната система след имобилизационен и студов стрес ..... стр. 75
3.1. Изследване ефектите на анандамида и пептидите от семейството на
Tyr-MIF-1 върху имобилизационна СИА ..... стр. 75
3.2. Изследване ефектите на AM251 и пептидите от семейството на
Tyr-MIF-1 върху имобилизационна СИА ..... стр. 77
3.3. Изследване ефектите на анандамида и пептидите от семейството на
Tyr-MIF-1 върху студова стрес-индуцирана аналгезия ..... стр. 78
3.4. Изследване ефектите на AM251 и пептидите от семейството на
Tyr-MIF-1 върху студова стрес-индуцирана аналгезия ..... стр. 79

4. Изследване ефектите на анандамид и AM251 с пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 - MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-К-MIF-1, върху СИА при третирани с налоксон животни ..... стр. 80
4.1. Изследване ефектите на анандамида и пептидите от семейството на
Tyr-MIF-1 при третирани с налоксон животни върху имобилизационна
СИА ..... стр. 80
4.2. Изследване ефектите на анандамида и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1
при третирани с налоксон животни върху студова СИА ..... стр. 83

4.3. Изследване ефектите на AM251 и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1
при третирани с налоксон животни върху имобилизационна СИА ..... стр. 85
4.4. Изследване ефектите на AM251 и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1

при третирани с налоксон животни върху студова СИА ..... стр. 88

5. Имунохистохимично изследване на ефекта на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху експресията на CB1-имунореактивни неврони в невропила на PAG ..... стр. 90

5.1. Имунохистохимично изследване на експресията на CB1-имунореактивни неврони в невропила на PAG в норма и след стрес ..... стр. 90

5.2. Имунохистохимично изследване на ефекта на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху експресията на CB1-имунореактивни неврони в невропила на PAG след стрес …..... стр. 93

ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ..... стр. 97

ИЗВОДИ ..... стр. 118

ПРИНОСИ ..... стр. 119

БИБЛИОГРАФИЯ ..... стр. 120

СПИСЪК НА ПРОЕКТИ, ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД ..... стр. 161

Списък на съкращенията

2-АГ	2-арахидонил-глицерол
АЕА	арахидонилетаноламид
АК	аминокиселина
АКТХ	адренокортикотропен хормон
ВР	ванилоиден рецептор
ВЧ	високочувствителни на СИА
ГАМК	гама-аминомаслена киселина
ГПСР	*G*-протеин-свързани рецептори
ГХ/МС	газова хроматография/мас-спектрометрия
ДИКБ	дифузен инхибиторен контрол на болката
ЕК	ендоканабиноиди
ЕКС	ендоканабиноидна система
иРНК	информационна рибонуклеинова киселина
ИС	имобилизационен стрес
И-СИА	имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия
КБД	(-)-канабидиол
КБН	канабинол
КМБ	кръвно-мозъчна бариера
КОФ	кортикотропин-освобождаващ фактор
КР	канабиноидни рецептори
МКА	мастнокисели амиди
МКАХ	мастнокисела амидхидролаза
НЧ	нискочувствителни на СИА
ПТ	пертусис токсин
РААС	ренин-ангиотензин-алдостеронова система
СИА	стрес-индуцирана аналгезия
СС	студов стрес
С-СИА	студова стрес-индуцирана аналгезия
СтИА	страх-индуцирана аналгезия
ТсХ	тънкослойна хроматография
Δ^9-ТХК	(-)-транс-Δ^9-тетрахидроканабинол

ТХ/МС	течна хроматография/мас-спектрометрия
ФМСФ	фенил-метил-сулфонил-флуорид
ХЙАН	химична йонизация при атмосферно налягане
цАМФ	цикличен аденозинмонофосфат
ЦНС	централна нервна система
ХХН ос	хипоталамо-хипофизо-надбъбречна ос
DMSO	диметилсулфоксид
HP	Hot-plate test
NMDA	*N*-метил-*D*-аспартат
nNOS	невронална азотноокисна синтетаза
NO	nitric oxide, азотен оксид
PAG	periaqueductal grey
PP	Paw-pressure test
SP	субстанция *P*

ВЪВЕДЕНИЕ

Стресът представлява комплексно динамично състояние на организма, при което нормалната хомеостаза или стабилността на неговата вътрешна среда са нарушени или застрашени. В хода на еволюцията са утвърдени сложни физиологични механизми за превъзмогване на стреса, които са обобщени като ***стрес-отговор***. Способността на индивида да се „справя" със стреса предопределя неговата способност да оцелява в условията на непрекъснато променящата се и често неблагоприятна външна среда. Намалените възможности за преодоляване въздействията на стреса са в основата на редица заболявания на нервната, сърдечно-съдовата, ендокринната, стомашно-чревната, половата и др. системи. Етиологичното значение на стреса за човешката патофизиология обуславя важността на изясняването на механизмите при развитието на стрес-отговора, а от тук и на възможността за оптимизирането му, както и за превенция на патологичните му прояви.

Комплексът от промени в поведението, насочени към преодоляване или избягване на опасността от страна на индивида, се означава като ***fight or flight syndrome*** и е широко и задълбочено изучаван. В условия на стрес се променят редица невро-ендокринни, психо-физиологични, имунни функции на организма. Стресът индуцира аналгезия, която е наречена ***стрес-индуцирана аналгезия (СИА)***. Този важен феномен е свързан с болковата перцепция, както и с модулацията на поведенческите отговори.

При стрес-индуцираната аналгезия участват редица медиаторни и невротрансмитерни системи – опиоидергична, адренергична, серотонинергична, азотноокисна, ендоканабиноидна и др.

Семейството на Tyr-MIF-1 включва четири ендогенни невропептида - MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, които са открити в централната нервна система. Тяхното разпределение 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. В антиноцицептивните ефекти на пептидите участват опиоидергичната, азотноокисната, хистаминергичната и адренергичната невромедиаторни системи.

Пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 повлияват стрес-индуцираната аналгезия.

Ендоканабиноидната система (ЕКС) представлява липидна сигнална система, включваща два *G*-протеин-свързани рецептора, ендогенните им лиганди и ензимната

система, ангажирана в синтеза и разграждането на лигандите. ЕКС има значение за модулирането на стрес-отговора на организма.

Нарушенията в ендоканабиноидната секреция и/или медиация обуславят отключването, развитието и обострянето на редица психопатологични състояния и неврологични заболявания, сред които напрегнатост, депресия, хронична болка.

В последните години проучвания върху ендоканабиноидната медиация показаха нейното кардиопротективно и противовъзпалително действие, от една страна, както и ролята й в развитието на различни нарушения - портална хипертензия при цироза у плъхове, антиген-индуцирана бронхиоларна констрикция у морско свинче, когнитивни дисфункции при болестта на Алцхаймер, нарушения на допаминергичната медиация, развитие на спонтанна хипертензия у плъхове, на глаукома, при карцином на простата и млечна жлеза у човек, в развитието на множествената склероза и много други. Изучаването на ЕКС и нейните взаимовръзки с други системи би имало практическо приложение в различни области.

Ендоканабиноидната система участва при стрес-индуцираната аналгезия.

Целта на настоящия труд бе да се проучи взаимодействието между невропептидите от семейството на Tyr-MIF-1 и ендоканабиноидната система при имобилизационен и студов стрес.

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

1. Канабиноиди и ендоканабиноидна система

Канабисът е сред първите растения, използвани от човека в медицината, при религиозни церемонии, с цел възстановяване. Началото на употребата му се губи преди 5000 години (Mechoulam, 1986).

Съществуват няколко вида канабис, като най-важни са *Cannabis sativa, Cannabis indica* и *Cannabis ruderalis*. От тях най-широко разпространена е *C. sativa,* която расте както в тропическия, така и в умерения температурен пояс. Най-важните субстанции, получени от канабиса, са марихуаната и хашишът. „Марихуана" е мексиканското название за евтин тютюн, но понастоящем се използва за означаване на изсушените листа и цветове на растението канабис. „Хашиш" е арабското наименование на индийския канабис и представлява вискозната смола от растението (Ben Amar and Leonard, 2002).

Днес е известно, че канабисът е източник на поне 66 съставки, наречени канабиноиди (ElSohly, 2002), като психотропните му ефекти се дължат предимно на (-)–транс-Δ^9-тетрахидроканабинола (Δ^9-ТХК).

През последните години се породи интерес към естествените материали – за получаване на текстил за облекло, продукти в хранително-вкусовата промишленост и лекарствената индустрия. В този смисъл се възобнови и интересът към марихуаната, на която са приписвани различни терапевтични ефекти. Но приемането й като терапевтично растение винаги е било трудно, поради невъзможността да се отдиференцират нежеланите й психотропни ефекти от лечебните й качества.

1.1. Исторически преглед

В началото са били инхалирани летливите масла на марихуаната в пушека й. Най-рано е била изолирана съставката канабинол (КБН), който е получен от Δ^9 – ТХК при съхранението на окосен канабис. В края на XIX в. *Woods, Spivey* и *Easterfield* изолират „червено интоксикиращо масло" от канабиса. Така се получава първият фитоканабиноид – червен маслен екстрат. Структурата му е определена от *R. S. Chan* в началото на 30-те години на XIX в., а е синтезиран през 1940 г. в лабораторията на *Adams* в САЩ.

Вторият фитоканабиноид, (-)-канабидиол (КБД), е получен от канабиса също през 1940 г. от *Adams* и колеги, вероятно в комбинация с канабидиоловата киселина. Тетрахидроканабиноиди са извлечени от канабиса през 1942 г. от *Wollner, Matchett, Levine* и *Loewe,* вероятно като смес от (-)-Δ^8- и (-)-Δ^9- ТХК. В канабиса ТХК и КБД присъстват предимно като киселини, които се декарбоксилират при нагряване.

През 1942 г. *Roger Adams* изнася пред университета в *Harvey* лекция за структурата и фармакологичните ефекти на тетрахидроканабинолите – активните съставки на канабиса. След 40-те години се приема, че психоактивните качества на марихуаната се дължат на комплекс от тетрахидроканабиноли. Едва през 1965 г. се открива превалиращата активна съставка на марихуаната - Δ^9-ТХК (Mechoulam and Gaoni, 1965). Това разкритие води до откриване на други, значително по-мощни канабиноидни агонисти, които улесняват по-нататъшните молекулярни фармакологични проучвания (Melvin and Johnson, 1987).

Структурата и стереохимичната формула на КБД и Δ^9-ТХК, които в естествено състояние представляват (-)-енантиомери, са доказани в лабораториите на *Raphael Mechoulam* - през 1963 г. за КБД и през 1964 г. – за Δ^9-ТХК. В същите лаборатории през 1965 г. са синтезирани (±)-Δ^9-ТХК и (±)-КБД, като скоро след това са синтезирани (+)- и (-)-енантиомери на Δ^9-ТХК, (±)-КБД и на Δ^8-ТХК.

В началото на XX в. изследванията върху канабиноидите се пренебрегват и поради политически причини. Актът на Харисън от 1914 г. води до пълна забрана на марихуаната през следващите 20 години. За това допринася и фактът, че през 60-те години драстично нараства хроничната употреба на психоактивни вещества, в това число и на марихуаната. Обществеността внимание е фокусирано основно на отрицателните ефекти върху здравето, което от своя страна стимулира провеждането на нови изследвания върху химичните съставки на марихуаната и техния механизъм на действие. През 1972 г. Конгресът на САЩ гласува създаването на Национален Институт за злоупотреба с лекарства, което стимулира разработване на програми за разкриване на лекарствения потенциал на марихуаната и други вещества, с които се злоупотребява.

През 70-те години на XX в. фармацевтичните компании разработват аналози на канабиноидите за лечение на различни заболявания. Фармацевтичната фирма *Pfizer* синтезира серия от съставки, значително по-мощни от Δ^9-ТХК, а именно левонантрадол. Той се прилага за неопиоидно третиране на постоперативни болкови синдроми, както и при повръщане след химиотерапия на злокачествени новообразувания. Употребата му е

ограничена поради дозо-зависимите психотропни странични ефекти – дисфория, замайване, нарушения на мисловния процес, сомнолентност.

Компанията *Eli Lilly* разработва серия от канабиноидни аналози за лечение на хронична болка. Една от съставките, набилон, е допусната до втората фаза на клиничните изпитания за лечение на повръщане, напрегнатост и някои други симптоми (Lemberger, 1999).

Проведени са и клинични изследвания от третата фаза, касаещи повръщането след химиотерапия на карциноми. Независимо, че резултатите показват нисък потенциал на злоупотреба с набилона, Националният Институт за злоупотреба с лекарства настоява той да остане в списъка на лекарствата от група II с ограничения в предписанието им. Изискани са допълнително проучвания относно бионаличността и поведението на набилона в организма, но компанията решава да прекрати изследванията. Докато във Великобритания, набилонът е одобрен като антиеметично средство без ограничения в предписанието му и се употребява от 70-те години на миналия век без да са отчетени проблеми със злоупотреба.

През 60-те и 70-те години на XX в. изследванията върху канабиноидите се увеличават значително. През този период канабисът има широка употреба във Великобритания и други западноевропейски държави като средство с възстановителен ефект. В същото време се обръща по-слабо внимание на лечебния ефект на канабиноидите. Впоследствие се проверява хипотезата, че психотропният ефект на канабиса се дължи на Δ^9-ТХК (Paton and Pertwee, 1973b). Сравняват се различните ефекти на канабиса и Δ^9-ТХК в експерименти с животни, както и с хора. Изучен е ефектът на канабиса да подобрява настроението или да предизвиква дисфория, да обостря психопатологични симптоми (напр. чувство за вътрешно напрежение, паника, параноя или усещане за изминало много време, докато астрономически е изминало кратко време, да предизвиква промяна в зрителните или звукови възприятия, да влошава паметта, да предизвиква гадене). Доказано е, че психотропните ефекти на канабиса се определят от Δ^9-ТХК.

През последните 20 години се набюдава „*смекчаване*" в отношението към марихуаната. Тя се употребява за терапевтични цели, което рефлектира и в разработването на канабиноиди.

През 1999 г. маринолът, който е синтетична форма на Δ^9-ТХК за перорално приложение, бе преведен от лекарствения списък II в лекарствен списък III. През

последните 10 години се натрупаха данни за ендоканабиноидната система, които са обещаващи за създаването на по-селективно действащи лекарства.

1.2. Канабиноидни рецептори

Канабиноидните лекарства предизвикват при гризачите характерна тетрада от ефекти - антиноцицепция, хипотермия, седация (понижена обща моторика), каталепсия. Тази комбинация вече придобива статут на скринингова процедура (Martin et al., 1991).

За първи път е предположено съществуването на отделно място за свързване на канабиноидите при отчитането на разлики във фармакологичното поведение на /-/- и /+/ - енантиомери на някои канабиноидни лиганди, напр. левонантрадол (Little et al., 1988). На молекулярно ниво Δ^9-ТХК инхибира активността на аденилатциклазата и понижава вътреклетъчните нива на цАМФ, което доказва, че действието му е медиирано от член на *G*-протеин-свързаните рецептори (ГПСР) (Howlett, 1984; Howlett and Fleming, 1984). Допълнително доказателство за действието на канабиноидните лиганди чрез G_i -протеин-свързан механизъм е чувствителността към токсина на пертусиса (ПТ) (Howlett et al., 1986).

Директното изследване на рецепторното свързване се оказва трудно, поради липофилната природа на канабиноидните лиганди. Положителен ефект в тази насока има синтезът на по-мощни лиганди (Melvin and Johnson, 1987). Благодарение на тях става възможно изследването на рецепторното свързване на канабиноидните лиганди в мозъка (Devane et al., 1988).

Първият канабиноиден рецептор CB1 е клониран от плъх през 1990 г., като са използвани ГПСР с позната последователност (Matsuda et al., 1990). По подобна методика е клониран и вторият рецептор – човешки CB2 през 1993г. (Munro et al., 1993).

През 2000 г. Soderstrom и съавтори клонират трети канабиноиден рецептор у амфибии, с което се доказва еволюционното постоянство на ЕКС.

Фармакологията на канабиноидните лиганди на двата рецептора е поразително сходна, въпреки наблюдаваната само 65% хомоложна последователност на предполагаемия свързващ участък (Munro et al., 1993). Това е различие спрямо останалите членове на семейството на ГПСР, където смяната на една единствена аминокиселина в специфичния участък на „*свързващия джоб”* може да доведе до сигнификантни разлики в рецепторната фармакология (Link et al., 1992; Parker et al., 1993).

В последно време обект на изследване е фармакологията на канабиноидните рецептори при различните животински видове. Докато при CB1 се наблюдава междувидово постоянство на аминокиселинната (АК)-последователност и фармакологията, то при CB2-рецептора се наблюдават фармакологични различия между плъхове, мишки и хора (Griffin et al., 2000). Засега не са открити други представители на семейството на канабиноидните рецептори. Предполага се, че ако такива съществуват, те могат да покажат значителни различия в АК-последователност в сравнение с CB1- и CB2-рецепторите.

В началото се е смятало, че CB1-рецепторът доминира в ЦНС, а CB2 - в периферната нервна система. По-нови открития, обаче, оспорват абсолютното разпределение на двата подтипа рецептори. Известно е, че CB1 е експресиран в определени мозъчни области, асоцирани с паметта и двигателната активност – хипокамп, малък мозък, базални ганглии (Johnson et al., 1992). Доказан е също така и в някои периферни тъкани – бели дробове (Rice et al., 1997), пресинаптични симпатикови нервни окончания (Ishac et al., 1996), *vas deferens* у мишки (Pertwee et al., 1996), съдовоендотелни клетки (Liu et al., 2000), съдови гладкомускулни клетки (Holland et al., 1999), хемопоетични клетки (Bouaboula et al., 1993).

CB2-рецепторите се асоциират предимно със слезката и имунокомпетентните клетки (Munro et al., 1993; Lynn and Herkenham, 1994). Съществуват доказателства за експресията на CB2-рецептори в имунни клетки с установен мозъчен произход (Galve-Ropert et al., 2000).

Към днешна дата съществуват все повече доказателства, че канабиноидните рецептори (КР) имат значение за развитието на мозъка. Някои по-ранни изследвания описват КР в развиващ се човешки мозък (Mailleux and Vanderhaeghen, 1992) и у плъх (Rodriguez de Fonseca et al., 1993). Подробните изследвания показват количествени различия в CB1-експресията в хода на развитието. По-високи нива се наблюдават във феталния и неонаталния период, в сравнение с тези при възрастен индивид (Glass et al., 1997). У плъхове се наблюдават разлики в експресията на иРНК както за CB1, така и за CB2 (Buckley et al., 1998). Независимо от тези различия, не се наблюдават нарушения в развитието на CB1-, CB2- или CB1/CB2-негативни мишки (Zimmer et al., 1999; Jarai et al., 1999; Buckley et al., 2000). Отчетена е повишена смъртност у CB1-негативни мишки, а причините са обект на бъдещи изследвания (Zimmer et al., 1999).

Има данни, подсказващи съществуването на още рецептори, опосредстващи канабиноидния ефект. Така например в мезентериалния кръвен басейн агонистът на КР

анандамид проявява вазодилатативен ефект, който е независим от CB1; при плъх липсва ефект (вазодилатация) от доказани агонисти на *CB1* у котка; отчита се ефект (вазодилатация) от доказан CB1-агонист у CB1-негативни животни и др. (Gebremedhin et al., 1999; Wagner et al., 1999; Jarai et al., 1999).

Следователно резултатите подсказват съществуването на друг рецептор, различен от CB1 и CB2, който медиира вазодилатативния ефект на анандамида.

Възможен *„кандидат”* е ванилоидният рецептор (VP1), който представлява неселективен катийонен канал, активиран от капсаицин. Въпреки че липсва хомоложност на VP1 както с CB1, така и с CB2, той се активира от анандамид, като това активиране води до вазорелаксация (Zigmunt et al., 1999; Smart et al., 2000). AM404, който инхибира транспорта на анандамида и е структурно сходен с него, активира VP1 по механизъм, различен от този, по който инхибира анандамидния транспорт (Zigmunt et al., 2000). Освен за анандамида няма данни за други канабиноидни лиганди, активиращи VP1.

Други автори предлагат данни в подкрепа на съществуването на канабиноидни рецептори, които са различни от CB1 и CB2. Например палмитоилетаноламидът (ПЕА) е CB2-селективен агонист, инхибиращ мастоцитната активация (Facci et al., 1995). При мишки, инжектирани с ПЕА, се наблюдава инхибиране на формалин-индуцираната болка, като този ефект се блокира от CB2-антагонисти (Calignano et al., 1998).

Съществуват *in vitro* данни за CB2-експресиращи клетъчни линии от различни животински видове, показващи разлики в биологичното поведение (Felder et al., 1992; Showalter et al., 1996; Sugiura et al., 2000). Тези и други подобни резултати подкрепят становището за съществуване на не-CB1, не-CB2 рецепторен подтип, обозначен с CBн (Di Marzo, 1998; Lambert and Di Marzo, 1999).

Получени са миши линии, негативни за CB1 (Ledent et al., 1999; Zimmer et al., 1999), за CB2 (Buckley et al., 2000), а също така и за двата рецептора (Jarai et al., 1999). Наблюдава се нарушена функция на Th-лимфоцитите при CB2-негативни животни (Buckley et al., 2000). Липсата на CB1-рецептора се проявява с хипоалгезия, понижена активност, повишена смъртност (Zimmer et al., 1999). При CB1-негативните мишки е понижено стрес-индуцираното освобождаване на ендогенни опиоиди (Valverde et al., 2000), което подсказва за връзката между опиоидната и ЕКС. Морфинът не индуцира освобождаване на допамин в *n. accumbens* при CB1-негативни мишки, което показва, че ЕКС може би участва в модулирането на опиоидното действие (Mascia et al., 1999).

Други експерименти дават възможно обяснение за влошената памет и обучение у лица, злоупотребяващи с марихуана (Bohme et al., 2000).

1.3. Предаване на сигнала

CB1- и CB2-рецепторите инхибират аденилатциклазата главно чрез потискане на G_i-протеина. Тяхното съвместно действие е доказано чрез хетероложна експресия на всеки от двата рецептора в клетъчни линии от бозайници. До момента в нативни тъкани или първични клетъчни култури е доказано действието само на CB1.

Способността на агонисти на канабиноидните рецептори да променят действието на йонните канали е доказана за първи път през 1992 г. (Caulfield and Brown, 1992; Mackie and Hille, 1992). *Caulfield* и *Brown* доказват инхибиране на волтаж-зависимите Ca^{2+}-канали по механизъм, чувствителен на ПТ. *Mackie* и *Hille* също показват, че канабиноидите инхибират *N*-типа Ca^{2+}-канали в някои клетки по рецептор-медииран механизъм, изискващ *G*-протеини, чувствителни на ПТ.

CB1 също така инхибират *N*- и *P/Q*-типовете Ca^{2+}-канали в култури от хипокампални неврони на плъх (Twitchell et al., 1997). Инхибирането на Ca^{2+}-каналите представлява механизъм, по който CB1 намаляват освобождаването на невротрансмитери и понижават възбудимостта на невроните. Анандамидът инхибира *L*-типа Ca^{2+}-канали в мозъчните съдове, което предизвиква вазодилатация (Gebremedhin et al., 1999). Канабиноидните рецептори имат обратен ефект по отношение на K^+-канали, като увеличават активността на волтаж-зависимите K^+-канали чрез намаляване на тяхното потискане (Deadwyler et al., 1993; Mackie et al., 1995). Активирането на канабиноидните рецептори също така понижава амплитудата на калиевия *D*-поток (Mu et al., 1999). Регулацията на йонните канали е свързана предимно с CB1 и в по-ниска степен с CB2 (Felder et al., 1995).

Проучвания върху антагонисти на канабиноидните рецептори сочат, че е налице постоянно базово ниво на активност на CB1 и CB2, дори в отсъствие на агонист (Landsman et al., 1997; Landsman et al., 1998; Portier et al., 1999). Тази конституционална активност на КР би имала важно значение за междуклетъчното сигнализиране.

Създаден е нов клас лиганди – *обратни агонисти.* При хроничното им въвеждане се увеличава експресията на G_i-протеина (Bouaboula et al., 1999b), повишават се нивата на CB1 в клетъчната мембрана, повишава се чувствителността към агонисти (Rinaldi-Carmona et al., 1998). Според тези данни обратните агонисти са клас лиганди, чрез които може да се модулира активността на ЕКС.

Пътищата на сигнализиране, отключвани от канабиноидните рецептори чрез G_i-протеина, са в началото на изследването им. CB1 активира митоген-активна протеинкиназа, която на свой ред регулира процеси на пролиферация и диференциация (Bouaboula et al., 1995). Активирането на митоген-активни протеинкинази от CB1 стимулира Na^+/H^+-обменния механизъм, променя вътреклетъчното pH, вероятно дори променя възбудимостта на някои неврони (Bouaboula et al., 1999a). Други автори съобщават за промяна в активността на гликогенсинтетазите, което може би има отношение към клетъчната пролиферация и енергийния метаболизъм (Gomez del Pulgar et al., 2000). Наред с това е наблюдавана непосредствена ранна генна експресия на ниво стриатум (Glass and Dragunow, 1995).

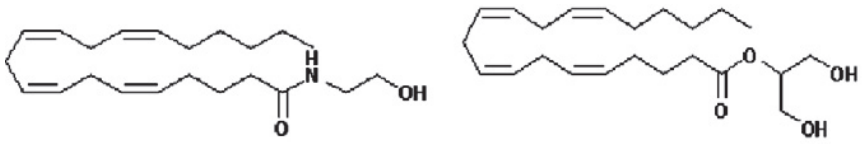
Взаимовръзката с невротрансмитерните системи разширява възможностите за вътреклетъчно предаване на сигнали чрез КР. Така например, активирането поотделно на CB1 и допамин-D2-рецепторите води до инхибиране на аденилатциклазата и понижаване на клетъчните нива на цАМФ. Докато при едновременното им активиране в невроните на стриатума се наблюдава повишаване на клетъчните нива на цАМФ (Glass and Felder, 1997). Свързването на CB1 с G_s се осъществява при съвместно активиране с *D2*-рецепторите, както и при инактивиране на G_i от ПТ (Felder et al., 1998). Специфичните агонисти на рецептора могат също така да предизвикат свързването му със специфични *G*-протеини (Glass and Northup, 1999). Както в активирано, така и в неактивно състояние CB1 могат да секвестират $G_{i/o}$-протеини и да инхибират предаване на сигнали от други семейства рецептори, които се нуждаят за действието си от свързване с тях (Vasquez and Lewis, 1999).

Има доказателства, че и други невротрансмитерни системи могат да модулират освобождаването на ендогенни канабиноиди. Активиране на *D2*-рецептори с допаминови агонисти повишава освобождаването на анандамид в стриатума (Griffida et al., 1999). По този начин самото тясно обкръжение задава допълнителни нива на регулация (освен известното директно повлияване).

1.4. Ендогенни канабиноиди

След клонирането на рецептора следва търсене на неговите ендогенни лиганди. Първият идентифициран и охарактеризиран е анандамидът или арахидонилетаноламид (*AEA*) (Фиг. 1 А) (Devane et al., 1992). Той е ейкозаноид с непозната дотогава структура, наречен от древната дума *ananda,* означаваща на санскрит благословия, блаженство. AEA е изолиран първоначално от свински мозък и показва сходни свойства с

растителния агонист Δ^9-ТХК (Devane et al. 1992). Свързва се както с CB1, така и CB2, като е с по-висок афинитет към първия (Felder et al., 1995). Определен е количествено в мозък на човек и на плъх. Най-високи концентрации са измерени в хипокампа, кората, таламуса и малкия мозък (Felder et al., 1996).



А. Б.

Фиг. 1. *Ендогенни канабиноиди (А) араихидонилетаноламид и (Б) 2-арахидонил-глицерол.*

АЕА принадлежи към семейство азот-съдържащи мастнокисели деривати - мастнокисели амиди (МКА). Те са открити най-напред в липидната фракция на птичи яйца. Първоначално се обръщало внимание предимно на техните противовъзпалителни свойства (Kuehl et al., 1957). Впоследствие е бил наблюдаван ензимен синтез на МКА в чернодробни микрозоми. Този клас молекули са изолирани, охарактеризирани и определени количествено в тъканите (Bachur et al., 1965). МКА се повишават в кардиомиоцити на куче при исхемия, но не се отчита съдържание на арахидонова киселина в екстракта, вероятно поради ниската й концентрация (Epps et al., 1979). АЕА е открит и сред лигандите, които модифицират *L*-типа волтаж-зависими йонни канали (Johnson et al., 1993). Не е изяснено дали съществуват рецептори за всички МКА (или етаноламиди) или само определени от тях участват в сигнализирането и предаването на импулси.

Освен АЕА са открити и други ендогенни лиганди на КР, които са мастнокисели деривати. Сред тях са дихомо-γ-линоленилетаноламидът, адренилетаноламидът и меадетаноламидът (Hanus et al., 1993; Felder et al., 1993; Priller et al., 1995). По-късно от черва на куче е изолиран 2-арахидонил-глицеролът (2-АГ) (Фиг. 1 Б). Той притежава свойства на канабиноиден агонист, но е по-слаб в сравнение с АЕА (Mechoulam et al., 1995). При определени обстоятелства 2-АГ може да е по-селективен по отношение на CB2 (Sugiura et al., 2000). Палмитоилетаноламидът също е предложен като канабиноиден агонист (Facci et al., 1995), независимо от това, че не се свързва с CB1 и CB2 (Felder et al., 1992; Showalter et al., 1996; Sugiura et al., 2000). За сметка на това палмитоилетаноламидът показва канабиноидоподобни физиологични ефекти, което

подсказва за съществуването на други подтипове канабиноидни рецептори (Di Marzo and Deutsch, 1998).

1.4.1. Синтез на ендогенните канабиноиди

За да се докаже, че ендогенните канабиноиди са невротрансмитери, е необходимо да бъдат установени процесите на техния синтез и разграждане. Поради липофилността им съществува слаба вероятност те да се съхраняват във водната фаза на синаптичните везикули. Доказано е, че прекурсор и депо за освобождаване на AEA са фосфолипидни молекули, които са открити сред мембранните фосфолипиди (Di Marzo et al., 1994; Sigiura et al., 1996a, 1996b). Фосфатидилетаноламинът търпи ензимно превръщане в *N*-арахидонилфосфатидилетаноламин, който представлява депо-формата на AEA. При този процес арахидоновата киселина се пренася от *sn*-1 позиция в *sn*-3 посредством *N*-арахидонилфосфатидилетаноламин–зависима-*N*-ацилтрансфераза. AEA се освобождава от *N*-арахидонилфосфатидилетаноламина след разкъсване на фосфодиестерната връзка с помощта на недобре идентифицирана фосфолипаза D, също активирана от *N*-арахидонилфосфатидилетаноламин (Di Marzo et al., 1996). Открит е и алтернативен път за образуване на AEA от арахидонова киселина и етаноламин чрез ензимен синтез (Deutsch and Chin, 1993; Devane and Axelrod, 1994). Освен това е доказано участието на рекомбинантна мастнокисела амидхидролаза (МКАХ), отговорна за разграждането на AEA след синтеза му от арахидонова киселина и етаноламин *in vitro*. Високата K_m сочи, че подобен процес е невъзможен *in vivo*, където МКАХ вероятно катализира реципрочния процес (Kurahashi et al., 1997; Katayama et al., 1999).

Няколко различни сигнала регулират освобождаването на ендогенни канабиноиди в синапса. AEA може да бъде освобождаван вследствие на деполяризация, напр. от йономицин или от високи K^+-концентрации (Di Marzo et al., 1994). Отчита се увеличено образуване на AEA в невронални клетъчни култури след глутаматна стимулация (Hansen et al., 1999). Повишение на AEA в стриатума се наблюдава след свързване на агонисти към *D2*-подобен допаминов рецептор и K^+-стимулирана деполяризация (Giuffrida et al., 1999).

1.4.2. Освобождаване и клетъчно захващане

След биосинтеза AEA се освобождава в извънклетъчното пространство и активира канабиноидния рецептор, разположен пресинаптично. Навлизането в клетката се осъществява чрез трансмембранна дифузия или чрез транспортер.

Благодарение на липофилната си природа AEA дифундира през плазмената мембрана в зависимост от концентрационния си градиент, който се поддържа от ензима мастнокисела амидхидролаза (МКАХ) (Glaser et al., 2003). МКАХ разгражда вътреклетъчния AEA като по този начин поддържа необходимия дифузионен градиент (Deutsch et al., 2001; Kaczocha et al., 2006). Инхибирането на МКАХ следователно намалява клетъчното навлизане на AEA (Glaser et al., 2003; Kaczocha et al., 2006).

Наред с простата дифузия е предложен и друг механизъм за навлизане на AEA в клетката, а именно чрез ендоцитоза (McFarland et al., 2004).

Според някои автори МКАХ разгражда AEA в извънклетъчното пространство, а в клетката навлизат арахидонова киселина и етаноламин. Това предположение подсказава наличие на МКАХ върху клетъчната мембрана.

Други автори доказват с помощта на конфокална флуоресцентна микроскопия и имунохистохимия, че ензимът е локализиран около клетъчното ядро (Egertova et al., 1998; Tsou et al., 1998; Glaser et al., 2003).

Най-много са привържениците на теорията за улеснена дифузия чрез мембранен преносител за AEA, който осигурява двупосочно преминаване на медиатора (Parmar et Ho, 2010). Доказано е инхибиране на транспорта посредством *AM*404, което потенцира действието на медиатора върху канабиноидния рецептор (Calignano et al., 1997).

Въпреки целенасоченото търсене на молекулата-преносител, до този момент трансмембранен преносител за ендогенни канабиноиди не е доказан.

Ето защо редица експериментатори предполагат, че съществуват алтернативни пътища за клетъчното им захващане и транспорт (Chicca et al., 2012). Доказано е, че 2-АГ блокира клетъчното захващане на AEA, което говори за наличието на конкурентни взаимоотношения между двата ендогенни канабиноида (Yates and Barker, 2009).

1.4.3. Ретроградно сигнализиране чрез ендоканабиноидите

През 2001 г. три независими екипа предлагат доказателства за ретроградното предаване на сигнала чрез CB1-рецептора.

Доказано е, че синтетичният CB1-агонист *WIN55212-2* индуцира супресия на инхибиторния пострецепторен ток в неврони от хипокампални култури на плъх (Ohno-Shosaku et al., 2001). С тези опити се доказва ***пресинаптичното действие на агониста***, както и медиирането на сигнала чрез CB1-рецептора.

Подобни резултати докладват и друга група от учени, които доказват, че деполяризационно-индуцираната супресия на инхибирането на пирамидни неврони в

хипокамп на плъх не се наблюдава след инкубация на срезовете с CB1-рецепторния антагонист *AM251* или *SR141716A* (Wilson and Nicoll, 2001).

Проведени са експерименти върху малкомозъчни клетки и е изследван ефектът на постсинаптичната деполяризация на клетки на Пуркиние върху възбудната пресинаптична трансмисия (Kreitzer and Regehr, 2001a). Авторите доказват, че деполяризацията на клетките на Пуркиние предизвиква намаление на възбудния пресинаптичен ток. Този феномен е наречен „*деполяризационно-индуцирана супресия на възбуждението*" (ДИСВ). В последващи опити те доказват, че постсинаптичната деполяризация предизвиква *освобождаване на медиаторна субстанция от постсинаптичното окончание.* Същите автори установяват, че постсинаптичното покачване на калция, необходимо за изявата на ефекта, се последва от редукция на пресинаптичния калциев поток. Намалението на калциевия поток настъпва паралелно с инхибирането на възбудния постсинаптичен потенциал. Авторите стигат до извода, че повишението на постсинаптичния калциев поток предизвиква понижение на пресинаптичния, като по този начин редуцира освобождаването на възбудни аминокиселини, за което *е необходим ретроградeн месенджер*. След като се отхвърля участието на различни „претенденти" (аминокиселини, ГАМК, аденозин), се доказва, че от една страна, CB1-рецепторният антагонист AM251 потиска деполяризационно-индуцираната супресия на възбуждението, а от друга, CB1-рецепторните агонисти инхибират възбудните постсинаптични потенциали.

Следователно, ендоканабиноидите действат като ретроградни месенджери и имат ключова роля в индуцирането на „*деполяризационно-индуцирана супресия на възбуждението*".

Наред с това е доказано, че ендоканабиноидите медиират деполяризационно-индуцираната супресия на инхибирането (ДИСИ) в хипокампа и ДИСВ в малък мозък на плъх (Kreitzer and Regehr, 2001b).

В редица опити е показано, че и ДИСИ в малкия мозък на плъх е ендоканабиноид-медиирана (Diana et al., 2002). Показано е, че освобождаването на ендоканабиноиди от клетки на Пуркиние в малкия мозък потиска спонтанното възбуждение на съседни клетки (Kreitzer et al., 2002).

Още по-нови данни сочат, че ДИСВ и ДИСИ имат отношение към модулацията на синаптичната пластичност в различни участъци на мозъка - *nucleus accumbens* (Robbe et al., 2002), амигдала (Marsicano et al., 2002), стриатум (Gerdeman et al., 2002), хипокамп (Carlson et al., 2002; Chevaleyre and Castillo, 2003).

Цялостното изясняване на физиологичното значение на ДИСВ и ДИСИ, както и на други ендоканабиноид-зависими клетъчни функции е обект на бъдещи изследвания.

1.4.4. Прекратяване на ендоканабиноидния сигнал

1.4.4.1. Прекратяване на ендоканабиноидната активност посредством високо-афинитетен транспорт.

Прекратяването на анандамидното сигнализиране е следствие на механизъм, сходен с този при класическите невротрансмитери, в това число и обратното захващане през плазмената мембрана. Поради техните липофилни свойства ЕК следват два пътя на обратно захващане от клетките, включващи улеснена и пасивна дифузия. Вече е описан и специфичен транспортен или „улесняващ" носител - протеин, който осигурява високо-афинитетно обратно захващане на ЕК. Предстои той да бъде изолиран или клониран.

Първоначалните данни върху невробластомни и глиомни клетъчни култури показват, че АЕА и палмитоилетаноламидът се захващат от клетките и бързо се разграждат от мембранно-асоциирана амидаза, която се инхибира от фенил-метил-сулфонил-флуорид (ФМСФ) (Deutsch and Chin, 1993). Последващи изследвания показват, че обратното захващане на АЕА от централните неврони е бърз, засищащ се, температурно-зависим процес, ангажиращ специфичен белтъчен носител (Di Marzo et al., 1994). Транспортът на АЕА не е свързан с йонни градиенти и не изисква АТФ (Hillard et al., 1997). Стойностите K_m и V_{max} на *AEA*-транспорта са близки за мастоцити на плъх (Rakhshan et al., 2000) и малкомозъчни гранулоцити (Hillard et al., 1997). Доказано е, че 2-АГ, (*R*)-метанандамидът и Δ^9-ТХК блокират анандамидния транспорт, т.е. и други канабиноидни лиганди могат да бъдат субстрати за анандамидния транспортер (Rakhshan et al., 2000).

Бромкрезолово зелено, кокаин и верапамил са инхибитори на добре известни, охарактеризирани транспортни протеини. Те не инхибират анандамидното захващане в някои клетки, което подсказва, че може би има друг транспортен протеин (Rakhshan et al., 2000). Компетитивното блокиране на високо-афинитетния анандамиден транспорт от *AM*404 в кортикални неврони на плъх усилва рецептор-медииираните ефекти на АЕА, което е евентуален механизъм чрез рецепторен блок да се наблюдава терапевтичен ефект (Beltramo et al., 1997).

Независимо от доказателствата за съществуването на транспортен протеин за АЕА до този момент все още не е клониран. Предполага се, че някои известни протеини,

например мастнокисели транслокази, мембранни мастнокисели транспортни протеини и др., могат да функционират като анандамидни транспортери (Rakhshan et al., 2000). Възможно е също така транспортерът за АЕА да се окаже друга молекула, несвързвана досега с транспортерите на мастни киселини.

1.4.4.2. Метаболитно разграждане на АЕА чрез мастнокисела амидхидролаза

Прекратяването на активността на ендоканабиноидите (ЕК) изглежда представлява двуетапен процес, който включва улеснен транспорт, последван от разграждане с помощта на МКАХ (Di Marzo and Deutsch, 1998). Частично е бил охарактеризиран ензим, отговорен за хидролизата на АЕА. Той е мембранно асоциран, *pH*-зависим, селективен и чувствителен на блокиране от ФМСФ (Desarnaud et al., 1995; Hillard et al., 1995; Maurelli et al., 1995; Ueda et al., 1997; Watanabe et al., 1998). Този ензим е бил клониран през 1996 г. и е определен като МКАХ. Молекулната характеристика на МКАХ показва наличие на каталитичен участък, сходен с тези на останалите амидази, трансмембранен участък и учатък за взаимодействие със SH_3–съдържащ белтък (Cravatt et al., 1996). Наред с амидазната си активност, МКАХ притежава и естеразна активност, която може би е отговорна за хидролизата на 2-АГ (Di Marzo et al., 1998; Particelli and Cravatt, 1999). Способността на АЕА да инхибира освобождаването на ацетилхолин се усилва от инхибирането на активността на МКАХ от *AM*374 в разрези от хипокамп на плъх (Gifford et al., 1999b). Подобно е повишаването на анандамидната активност вследствие инхибиране на транспортера (Beltramo et al., 1997).

В опити *in vitro* е доказано, че както рекомбинантната МКАХ (Kurahashi et al., 1997; Arreaza et al., 1997), така и чистият ензимен екстрат (Schmid et al., 1985; Devane and Axelrod, 1994; Ueda et al., 1995; Sugiura et al., 1996a) притежават анандамид-синтезираща активност. Тази активност е силно зависима от високата концентрация на арахидонова киселина и етаноламин, като K_m-стойностите й варират в порядък от микро- до милимол. Вероятно това е и причината при физиологични условия ензимът да проявява своята хидролазна, а не синтетазна функция (Ueda and Yamamoto, 2000).

Последни изследвания подсказват връзката между транспортните процеси и ензимното разграждане на ендоканабиноидите. ФМСФ, арахидонил трифлуорометил кетон и метил арахидонил флуорофосфонат представляват инхибитори на МКАХ, които понижават обратното захващане на АЕА в някои клетки (Rakhshan et al., 2000).

Най-мощният инхибитор на МКАХ, метил арахидонил флуорофосфонатът, намалява транспортът само с 50% при концентрация, превишаваща значително K_i – стойността, което подсказва, че МКАХ самостоятелно не улеснява транспорта на АЕА (Rakhshan et al., 2000).

1.4.5. Измерване на ендогенните канабиноиди

В началото на 90-те години на XX в. са измерени ЕК в мозъка и периферните тъкани. Задачата се оказва трудна поради липофилната им природа и относително краткия им полуживот. Различните техники за екстракция, частично пречистване и количествено определяне на ЕК се различават съществено помежду си и предполагат получаване на артефакти при определяне на тъканните нива.

АЕА е бил извлечен от тъкани и телесни течности посредством различни органични разтворители, например ацетон, толуен, етилов ацетат, хлороформ, както и смес от хлороформ и метанол. Описано е, че АЕА може да бъде получен химически по време на екстракционни процедури в присъствие на киселини или основи (Yang et al., 1999) и нивата му се увеличават правопропорционално на времето, изминало от смъртта (Schmid et al., 1995; Felder et al., 1996).

След екстракция с разтворители АЕА е бил частично пречистен посредством тънкослойна хроматография (ТсХ) или екстракция върху твърда фаза. Използвани са различни техники за определянето му след екстракция и парциално пречистване, включително газова хроматография/мас-спектрометрия (ГХ/МС), течна хроматография/мас-спектрометрия (ТХ/МС), химична йонизация при атмосферно налягане (ХЙАН) и др. Всеки от тези методи има своите ограничения. Например ГХ/МС изисква дериватизация на АЕА преди определянето. ТХ/МС е по-малко селективна в сравнение с други техники. Някои техники изискват специално скъпо оборудване. Включването на вътрешен стандарт позволява получените данни за АЕА да се унифицират, като по този начин се повиши прецизността на изследването. Използването на ХЙАН-МС повишава чувствителността на изследването за АЕА до стойности от порядъка на фемтомоли (Koga et al., 1997).

Данните от измерванията на АЕА в литературата показват висока вариабилност. Някои автори съобщават за недоловими нива на АЕА в мозък на плъх (Kempe et al., 1996; Yang et al., 1999). Други автори намират нива от порядъка от 4.3 *р*мол/г тъкан (Sugiura et al., 1996a) до 11 *р*мол/г тъкан (Cadas et al., 1997) в целия мозък, 20 *р*мол/г тъкан в таламус на плъх и 29 *р*мол/г тъкан в хипокамп на плъх (Felder et al., 1996).

AEA е измерен също така и в периферни тъкани - бъбрек (Deutsch et al., 1997), матка (Schmid et al., 1997b), слезка (Yang et al., 1999), макрофаги (Schmid et al., 1997a), кръв (Giuffrida and Piomelli, 1998), кожа (Felder et al., 1996).

Подобно на променящата се експресия на КР нивата на AEA в мозък на плъх показват също така и различия в отделните възрасти на животните (Fernandez-Ruiz et al., 2000). Измерени са нива на AEA в главен мозък, малък мозък, хипокамп, както и някои периферни тъкани в различни етапи от постнаталното развитие (Koga et al., 1997). При двуседмични плъхове са измерени много ниски нива на AEA в главен мозък, малък мозък и хипокамп. През $6^{-та}$ седмица нивата във всички мозъчни участъци нарастват, като допълнително увеличение е отбелязано на $12^{-та}$ седмица. След $24^{-та}$ седмица нивата на AEA в тези три области значително намаляват. Този модел отразява и наблюдаваното за CB1 по време на постнаталното развитие. Заедно с AEA се отделят и мастнокисели амиди с различна дължина на веригата и степен на наситеност. Допълнителни изследвания ще уточнят дали тези молекули действат съвместно или самостоятелно с оглед регулацията на развитието.

Наскоро две отделни групи от учени измериха базалното ниво на AEA и след стимулация в диализат от мозък на плъх. Измерен е AEA в *PAG* на плъх в отговор на болкови стимули и е показано, че нивото на AEA нараства 140% (Walker et al., 1999). Този опит показва възможност за отчитане на атомоларни концентрации, но при отчитанията не е прилаган вътрешен стандарт. Измерен е AEA в дорзален стриатум и са получени резултати от порядъка на пикомол (10^{-12}) (Giuffrida et al., 1999). Авторите отчитат покачване от 175% в базалните нива на AEA в отговор на стимулация с *KCl* и 800% повишение в отговор на *D2*-допаминовия агонист квинпирол. Причината за значителната разлика в резултатите не е изяснена.

Възможността за отчитане нива на AEA в мозък на свободноподвижни плъхове, подлагани на различни стимули, би дало възможност за допълнително охарактеризиране на канабиноидното сигнализиране по множество физиологични пътища.

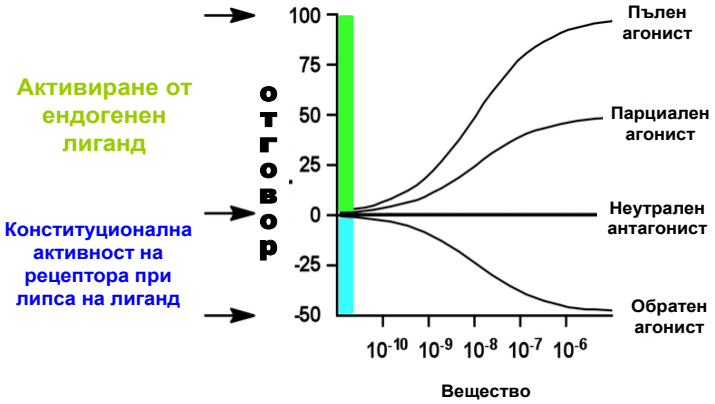
На този етап има противоположни литературни данни по отношение нивата на AEA в мозъка и периферните тъкани, което затруднява интерпретацията на получените резултати.

Повишаването на селективността и чувствителността на измерванията ще допринесе за обогатяване знанията ни относно съхраняването, освобождаването и обратното захващане на отделните ендоканабиноиди.

1.4.6. Терапевтични възможности и индикации на ендогенните канабиноиди

Способността на ЕКС да модулира други невротрансмитерни системи може да се разграничи на няколко нива. Едно от тези нива е активиране или антагонизиране на CB1. Дозо-зависимите психотропни странични ефекти ограничават употребата на директно-действащи рецепторни агонисти. Наред с това разработката на парциални рецепторни агонисти може да намали страничните ефекти, а широкото разпространение на CB1 в мозъка прави парциалните агонисти възможни терапевтични агенти (Gifford et al., 1999a). Парциалните агонисти притежават допълнително предимство, а именно по-ниска степен на обратна регулация, поради което пациентът е изложен на по-нисък риск от развитие на толерантност към лечението.

Известни са два потенциални механизма на действие на канабиноидните антагонисти. Тъй като изглежда е налице тонично, конституционално зададено ниво на активност на КР дори в отсъствие на агонист, както неутралните антагонисти, така и обратните агонисти имат потенциал на терапевтични агенти. Неутралните антагонисти блокират повишаваната от агониста активност, докато обратните агонисти понижават конституционално зададеното ниво на рецепторна активност в отсъствие на агонист (Графика 1).



Графика 1. *Представяне действието на пълен агонист, частичен агонист, неутрален антагонист и парциален агонист на даден рецептор.*

По-висока степен на терапевтична специфичност може да се постигне чрез употреба на потенциатори или алостерични модулатори, чувствителни към конкретен субтип рецептори. Идентифицирани са модулатори за много от протеин-*G*-свързаните КР. Те могат да повишат или понижат отговора към агонистите, като са лишени от собствено агонистично действие (Lazareno et al., 2000; Tian et al., 2000). Употребата на активатори на CB1 засяга само рецепторите, активирани от ендогенни лиганди. Това би

могло да снижи някои странични ефекти, свързани с прилагането на екзогенни канабиноидни лиганди, които влияят както на активни, така и на неактивни анандергични синапси.

Все по-разширяващата се информация за освобождаването, обратното захващане и разграждането на ЕК дава нови насоки за терапевтично въздействие. Клинично са били приложени някои инхибитори на обратното захващане за отделни невротрансмитерни системи, включително, серотонин и норепинефрин с цел повлияване на депресивни състояния, напрегнатост и други психогенни разстройства (Wong et al., 1995; Kent, 2000). Вече са идентифицирани селективни инхибитори на обратното захващане на AEA (Beltramo et al., 1997). Тези инхибитори биха функционирали подобно на рецепторни активатори, като биха повлияли единствено на рецепторите, изложени на действието на ендогенни лиганди - по този начин се намалява възможността за нежелани странични реакции.

Освен това са идентифицирани инхибитори на МКАХ, ензима, отговорен за разграждането на AEA (Boger et al., 1999, 2000). Този клас вещества би увеличил времето на активация на КР по механизъм, сходен с този на холинестеразните инхибитори, които вече се използват за удължаване полуживота на ацетилхолина в синапса и третиране на болестта на Алцхаймер (VanDenBerg et al., 2000; Emilien et al., 2000). Въпреки всичко, широкото разпространение на МКАХ в ЦНС и периферните тъкани поставя въпроса за специфичността на този подход.

Молекулярната база за физиологичните ефекти на канабиноидите и ендоканабинодите започва да се изяснява. Един от основните механизми, по които ЕКС упражнява своите физиологични ефекти, е чрез *взаимодействието с* и *модулирането на* други невротрансмитерни системи. Активирането на КР засяга редица пътища за междуклетъчно сигнализиране и води до активиране на K^+-канали и *инхибиране* на аденилатциклазата и волтаж-зависимите Ca^{2+}-канали.

В крайна сметка канабиноидната система в ЦНС *понижава освобождаването на невротрансмитери в синапса*, модулирайки по този начин синаптичното предаване. Канабиноидите действат чрез канабиноидни рецептори като модулират допамин-, глутамат-, опиат-, адренергичната, а вероятно и други системи.

Емпирично е известно от векове, че канабиноидните агонисти притежават благотворно терапевтично въздействие при различни болестни състояния. Но едва в последните години започна документирането на участващите биологични механизми. Вече е известно, че антагонизирането на КР може да има значителни терапевтични

приложения. Някои добре известни странични ефекти на канабиоидните агонисти компрометират действието на тези съставки – седация, когнитивни разстройства, тахикардия, постурална хипотензия, сухота в устата, атаксия, имуносупресивен ефект, психотропни ефекти.

Възникването на страничните ефекти при употребата на канабиоидите е по-слабо проучено. Физиологичните механизми, отговорни за възникването на тези ефекти, не са проучени както за агонистите, така и за антагонистите. Липсата на фармакологична селективност може да допринесе за възникването им, тъй като най-ранно разработените канабиоидни агонисти са били еднакво селективни и за двата рецептора - CB1 и CB2. Възможно е да бъдат избегнати повечето, ако не и всички нежелани ефекти чрез нов подход, базиран на последните открития. Те включват таргетиране на отделен канабиоиден рецепторен подтип, както и повлияване на освобождаването, обратното захващане и разграждането на ЕК.

Специално внимание представлява отношението на ЕКС към възникването на аналгезия. Канабиоидите притежават потенциална възможност да се използват като лекарства. Агонистите предизвикват антиноцицепция, посредством *пътища в гръбначния мозък*, измерена чрез *tail-flick*-теста, както и посредством *супраспинални пътища*, измерена чрез *hot-plate*-теста. Тези ефекти могат да бъдат блокирани от специфични CB1-антагонисти (Martin and Lichtman, 1998; Manzanares et al., 1999).

Резултатите показват, че ЕК действат самостоятелно и/или съвместно с опиоиди при модулирането на болковия отговор (Welch and Stevens, 1992; Smith et al., 1994; Meng et al., 1998). Също така е доказано, че канабиоидните съставки са ефективни в модели на алодиния (болка, възникваща от обичайно неболезнени стимули) у плъхове (Martin et al., 1999). Има и доказателства, че канабиоидите са ефективни при терапията на мигренозното главоболие (Russo, 1998).

Други видове патологични болки, резистентни на всички засега известни схеми на лечение и чието купиране представлява съществена здравна потребност, могат също така да бъдат третирани с канабиоиди (Mao et al., 2000). Периферните CB2 могат да се свържат с болкова модулация на мястото на травмата чрез инхибиране на възпалителния отговор (Jaggar et al., 1998; Calignano et al., 1998).

Следователно, съществуват множество възможности за болкова модулация от страна на канабиоидите, особено чрез новоизучените механизми.

2. Опиоиди и ендогенна опиоидна система

Ендогенната опиоидна система е модулатор на жизненоважните адаптационни процеси в човешкия организъм. Тя е ангажирана в поддържането на физиологичното равновесие между нервните и хуморални отговори, посредством опиоидни и антиопиоидни пептиди (Akil et al., 1972, 1976, 1984; Cesselin, 1995).

Опиоидергичните неврони и опиоидните рецептори са широко разпространени в централната и периферна нервна система, което обуславя участието на опиоидната система в контрола на аналгезията, респираторната, кардиоваскуларната, невро-ендокринната секреция, моторната активност, обучението и паметта, зависимостта и толерантността. Ефектите на опиоидните пептиди се осъществяват чрез опиоидни рецептори - μ, δ, κ, λ, σ, ε и др., които са разпространени както в централни структури, така и в периферията (Banks et al., 1985, 1993, 1997).

В ЦНС се синтезират и освобождават молекули, които могат да бъдат квалифицирани като антиопиоиди. Антиопиоидни свойства притежават различни пептиди – ноцицептин, невропептид FF, холецистокинин. Те не упражняват само антиопиоидно действие, но и оказват морфиномиметични ефекти, които се антагонизират от налоксон (Cesselin, 1995).

Характерно за антиопиоидното действие на пептидите е потискането на морфиновата аналгезия и някои форми на анелгезия, провокирана от стрес; понижаване на толерантността към леворфанол; провокиране синдрома на абстиненция при мишки със зависимост към морфина (Kastin et al., 2002, 2003).

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

Ендогенните невропептиди от семейството на Tyr-MIF-1 са: MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1. Те се отнасят към ендогенните опиоидни пептиди. Открити са в ЦНС. Тяхното разпределение и специфичните им места за свързване съвпадат с разпределението на опиоидните рецептори. Посочените невропептиди могат да блокират опиоид-подобни ефекти при специфични тест-системи.

2.1.1. MIF-1

Най-рано е установено инхибиращото му действие върху освобождаването на меланоцит-стимулиращия фактор (Scimonelli and Celis, 1982). Известен е и като PLG – на

базата на аминокиселинната му последователност (пролин, левцин, глицин).

Изолиране

Изолиран е от говежди хипоталамус (Nair et al., 1971). Първоначално от замразени върху сух лед хипоталамични фрагменти от умъртвено животно, съхранявани при минус 20˚C с последваща химическа екстракция и филтрация (Schally and Kastin, 1966). Идентифициран е посредством тънкослойна хроматография; разграничаването на синтетичните от естествените вещества се осъществява чрез мас-спектрофрагментация (Nair et al., 1971). По-нови идентификационни техники откриват MIF-1 в мозъчна кора, от която е отстранена хипофизата, в *eminentia mediana*, хипоталамус, дори в *organum circumventriculare* (Kheterpal et al., непубликувани данни).

MIF-1 не се получава от Tyr-MIF-1 в кръвта, въпреки че двата пептида имат три еднакви аминокиселини. Основен продукт на разграждането на Tyr-MIF-1 е Tyr-Pro, а не MIF-1 (Kastin et al., 1994).

Метаболизъм

MIF-1 се разгражда напълно в серум на плъх за 1ч при 37˚C, докато в човешка плазма/серум липсва разграждане (Walter et al., 1975). 50% от наличното количество в серума на плъх се разгражда при 37˚C за 5мин, докато у човека същият ефект се получава след 5 дена (Kastin et al., 1994). Подобни резултати подсказват наличие на видово специфични пептидази за MIF-1.

Разпределение

Изследванията както *in vitro,* така и *in vivo* показват, че MIF-1 е значително по-стабилен у човека, отколкото у плъх. След инжектиране у човек, 50%$^{-но}$ намаление се установява след 15 мин, а 70% от радиоизотопната субстанция в урината представлява интактно вещество (Redding et al., 1974). Девет минути след интравенозно въвеждане на MIF-1 в плъх 50% от веществото изчезва, а 1ч по-късно в урината не се открива интактна субстанция (Redding et al., 1973). Високи концентрации се отчитат в епифизата и хипофизата (Dupont et al., 1975). В мозъчната кора, дорзалния хипокамп и хипоталамуса се откриват по-ниски, но равни помежду им количества.

Рецепторно свързване

Не са известни много опити за изолиране на селективни свързващи участъци с висок афинитет за MIF-1, за разлика от Tyr-MIF-1. Това е така поради невъзможността MIF-1 да бъде йодиран. Независимо от това е открит свързващ участък за MIF-1 в стриатума на плъх (Chiu et al., 1983). Други участъци с по-ниска плътност са открити в хипоталамуса и кората. Посредством маркирани лиганди е докзано, че MIF-1-свързвашият участък има отношение към алостеричното модулиране на допаминовия рецептор (Fisher et al., 2006).

MIF-1 не свързва Tyr-MIF-1-свързващите участъци, както и опиоидните рецептори в мозъка на плъх (Luciano et al., 1981; Zadina et al., 1982; Zadina et Kastin, 1986).

Кръвно-мозъчна бариера

MIF-1 се транспортира посредством специфична преносна система от кръвта към мозъка, но не и от мозъка към кръвта (Banks and Kastin, 1994). Системата е частично засищаща се. Само относително високи количества (над 10 мг/кг) причиняват инхибиране.

Антиопиоидни ефекти

MIF-1 е първият пептид с доказани антиопиоидни ефекти. Той не свързва опиоидните рецептори (Luciano et al., 1981; Zadina et al., 1982; Zadina and Kastin, 1986).

MIF-1 блокира аналгетичния ефект на морфина и енкефалина при *tail-flick*-теста (Kastin et al., 1979). За да се проявяат антиопиоидните му ефекти не е необходимо присъствието на хипофизата (Kastin et al., 1980).

Антиопиоидното действие на MIF-1 е доказано в опитни постановки с плъхове (Kastin et al., 1980; 1979; Yehuda et al., 1980; Galina and Kastin, 1985), мишки (Dickinson and Slater, 1980; Kastin et al., 1984, 1985; Teskey and Kavaliers, 1985; Kavaliers and Hirst, 1986a, 1986b, 1986c), охлюви (Kavaliers, 1987), риби (Ehrensing et al., 1982). Известни са експериментални постановки, включващи и хора (Ehrensing et al., 1984).

Използваните тестове включват *tail-flick* (Kastin et al., 1979, 1980), *hot plate* (Kavaliers and Innes, 1993), хипомотилитет (Yehuda et al., 1980), хипотермия (Yehuda et al., 1980). Наблюдавано е обръщане на ефекта както на екзогенните, така и на ендогенните опиоиди.

Действието на MIF-1 наподобява това на налоксона по отношение протективния ефект при хеморагичен шок у плъхове (Krause et al., 1984). Също така той понижава стрес-индуцирания прием на храна (Pulvirenti and Kastin, 1988).

В други случаи, ефектите на MIF-1 се различават от тези на налоксона - във *vas deferens* (Kastin and Olson, 1979; Dickinson et Slater, 1980), по отношение понижението приема на храна при плъхове с лезия на вентромедиалния хипоталамус (Kastin and Olson, 1979), по отношение ефектите на *Leu*-енкефалина върху сърдечно-съдовата система у куче (Sander et al., 1982), бензодиазепин-индуцираната локомоторна хиперактивност и приема на храна (Kastin et al., 1989), по отношение хиперфагията, индуцирана от пептид *YY* (Nair et al., 1971). Тези различия подсказват разлики в действието на MIF-1 и опиоидите по отношение на мускулния контрактилитет и храненето.

Наред с опиоидните и антиопиоидни ефекти, MIF-1 има и ефекти по отношение на болестта на *Parkinson*, някои дискинетични прояви, депресията, както и други общи ефекти – върху ученето, поведението, температурата.

2.1.2. Tyr-MIF-1

Изолиране

Изолиран е от париетална част на кората на нормален човешки мозък (Horvath et Kastin, 1990) и от говежди хипоталамус (Horvath et Kastin, 1989). Концентрациите на пептида са по-ниски, когато тъканите са взети от трупен материал при това доста време след настъпване на смъртта, което не е изключва действието на автолитични процеси.

При изследването на свежи тъкани, например по време на аутопсия, концентрациите на Tyr-MIF-1 са около 500 пъти по-високи (Hackler et al., 1995). Подобно поведение е характерно предимно за ендогенни субстанции с известен метаболизъм.

Метаболизъм

За разлика от MIF-1, Tyr-MIF-1 се разгражда в плазмата *in vivo* и *in vitro* (Kastin et al., 1994). В резултат на това се образува предимно дипептидът *Tyr-Pro*, а не MIF-1, който се образува в мозъчните митохондрии (Kastin et al., 1995b).

Рецепторно свързване

През 1982 г. в мозъчни синаптични плазмени мембрани е открит участък с висок афинитет и насищане, специфичен за Tyr-MIF-1 (Zadina et al., 1982), за който MIF-1 не се конкурира.

Най-високи концентрации на Tyr-MIF-1 са отчетени в кората, стриатума и амигдалата, а ниски – в моста и медулата, макар че и те са няколко пъти по-високи от откритите в периферната нервна система.

Свързването на Tyr-MIF-1 към синаптичната мембрана на мозъчни клетки се предотвратява от някои ендогенни опиоиди (напр. хеморфин, морфицептин, цитохрофин), но не и от лиганди на мю- (μ), делта- (δ), капа- (κ) и сигма- (σ) рецепторите, както и на ГАМК/бензодиазепиновите рецептори (Zadina and Kastin, 1985; Zadina et al., 1990a; 1990b).

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., 1994). Въвеждането на морфин в 5 поредни дни редуцира свързването както на йодирания, така и на титрирания Tyr-MIF-1 към неговия свързващ участък, а μ- и δ-опиоидните рецептори увеличават броя си (Zadina et al., 1989).

Разпределение

Най-висока Tyr-MIF-1-активност в мозъка е открита радиоимунографски в епифизата и хипоталамуса (Kastin et al., 1981). Таламусът и стриатумът показват значително по-висока радиоимуноактивност в сравнение с останалите мозъчни структури, следвани от хипокампа, малкия мозък, кората и средния мозък. Мозъчната концентрация се покачва до 10 дена след отстраняване на епифизата, като може да се наблюдава денонощен цикъл с максимални концентрации през нощта и минимални през деня.

Имунореактивната Tyr-MIF-1-активност в кръвта се понижава след епифизектомия, но се покачва след хипофизектомия, адреналектомия и/или овариектомия (Kastin and Dickson, 1987; Kastin et al., 1992, 1993).

Имунореактивната плазмена Tyr-MIF-1-активност е по-висока у спонтанно хипертензивни плъхове в сравнение с *Wistar-Kyoto*-контролите (Kastin et al., 1986). Денонощните плазмени концентрации са обратно-пропорционални на мозъчните и са най-високи в 4 ч. сутринта. Отстраняването на *ganglion cervicale superior* не променя

плазмената концентрация на имунореактивната Tyr-MIF-1-активност. Ефектът на хипофизектомията остава значителен до 1 седмица след интервенцията, като допълнително се засилва на 3$^{-та}$, 6$^{-та}$ и 12$^{-та}$ седмица. Ефектът е обратим при хронично приложение на кортикостерон в продължение на 20 дена, но не и от тироксин и/или естроген или прогестерон (Kastin et al., 1995a).

В хода на онтогенезата плазмена Tyr-MIF-1-подобна-активност у плъхове може да бъде отчетена имунологично най-рано на 5$^{-ия}$ ден, като се покачва и на 15$^{-ия}$ ден достига нивата при възрастните индивиди (Kastin et al., 1992).

Имунореактивна Tyr-MIF-1-активност не е отчетена в женско мляко (Graf et al., 1984), макар че в него са открити ендогенни опиоиди (Renlund et al., 1993; Zanardo et al., 2001).

Кръвно-мозъчна бариера

Липоразтворимостта на пептидите се счита за най-значим индикатор за физикохимичните им свойства с оглед преминаване на кръвно-мозъчната бариера (Banks and Kastin, 1985). Като цяло зависимостта между липоразтворимостта на пептидите и преминаването им през КМБ е линейна с изключение на тези с *N*-терминален тирозин, какъвто е случаят с Tyr-MIF-1. Оказва се, че това се дължи не на слабото проникване, а на наличието на система за бързото му извличане.

За Tyr-MIF-1 е открита насищаща се система за транспорт *от мозъка към кръвта* (Banks and Kastin, 1984; 1994; Banks et al., 1987; 1990). Системата е специфична за Tyr-MIF-1 и *Met*-енкефалина (който също притежава *N*-терминален *Tyr*). Инхибира се само от споменатите пептиди, но не и от техните фрагменти (Banks et al., 1986) или техни изомери, напр. *D*-Tyr-MIF-1-стереоизомер (Banks et al., 1990).

По-късно са проведени експерименти с известни хормони и никоя от общо 21 субстанции не инхибира мозъчно-кръвната система за транспорт на Tyr-MIF-1 (Banks and Kastin, 1988).

Изненадващо е, че въпреки високата специфичност на сиситемата за транспорт на Tyr-MIF-1, тя свързва също и *Met*-енкефалина (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met). Очевидно е структурното различие, въпреки съществуващите функционални сходства (опиоидно модулиране). Освен това тази обща транспортна система не представлява рецептор за никой от малките пептиди (Maresh et al., 1999).

Последни открития посочват участието на *P*-гликопротеина в транспорта на ендорфините от мозъка към периферията (King et al., 2001), но също така е доказано, че

липсата на *P*-гликопротеин не се отразява на транспорта на Tyr-MIF-1 и *Met*-енкефалин, което подчертава специфичността на системата (Kastin et al., 2002).

Третирани с морфин по време на пре- или постнаталния период опитни животни показват повишена активност на Tyr-MIF-1-извеждащата система (Harrison et al., 1993; Banks et al., 1996). Може да се предположи, че извеждащият транспортер повишава експресията си при перинатална експозиция, но биохимичната природа на транспортната система все още не е разкрита.

Tyr-MIF-1 преминава КМБ откъм кръвта, като системата няма насищане нито от Tyr-MIF-1 самостоятелно, нито от *Met*-енкефалин (Banks and Kastin, 1994). Навлизането наподобява по-скоро пасивна дифузия, основана на физико-химичните свойства на веществото.

Антиопиоидни ефекти

Подобно на MIF-1, Tyr-MIF-1 притежава опиоидни и антиопиоидни ефекти. Антиопиоидната активност на Tyr-MIF-1 е доказана чрез множество опити у плъхове (Bocheva and Dzambazova-Maximova, 2004b), мишки (Kastin et al., 1984, 1985; Kavaliers and Hirst, 1986; Galina and Kastin, 1987; Galina and Kastin, 1988; Wiebe and Kavaliers, 1988; Fukanaga et al., 1999), морски свинчета (Kavaliers and Innes, 1992, 1993), охлюви (Kavaliers, 1987) и други (Lipa et al., 1989).

В посочените опитни постановки антиопиоидната активност на Tyr-MIF-1 се изразява в обръщане ефекта на екзогенните опиоиди, отчетено посредством тестовете *tail-flick* (Kastin et al., 1984, 1985), *tail-pinch* (Fukanaga et al., 1999), *hot-plate* (Kavaliers and Innes, 1992; Kavaliers and Innes, 1993) и проследяване на активността на невроните на *locus coeruleus* (Yang and Chiu, 1997).

Tyr-MIF-1 обръща ефектите на ендогенните опиоиди, индуцирани чрез принудително плуване в топла (но не в студена) вода (Kavaliers, 1987; Galina and Kastin, 1987; 1988; Fukanaga et al., 1999), поставяне в непозната обстановка (Galina and Kastin, 1987; 1988), имобилизация (Kavaliers and Innes, 1992; Bocheva and Dzambazova-Maximova, 2004a, 2004b), психологичен стрес (Fukanaga et al., 1999), електрически шок (Galina and Kastin, 1987, 1988; Fukanaga et al., 1999), агресия и загуба (Kavaliers and Hirst, 1986) и други (Kastin et al., 1985; Lipa et al., 1989).

В някои от споменатите опити с обръщане на ендогенната аналгезия антиопиоидният ефект на Tyr-MIF-1 се наблюдава след лек до умерен стрес, но не и след

по-интензивен стрес, като кривата на зависимостта доза/отговор има вид на обърнато *U*, подобно на наблюдаваната при MIF-1 (Galina and Kastin, 1988).

Tyr-MIF-1 усилва абстинентния синдром, наблюдаван при морфин-зависими плъхове (Malin et al., 1993). Приложението му блокира хипералгезията, индуцирана от β-ендорфина и морфицептина (Zadina et al., 1987), което свидетелства за антиопиоидни ефекти.

От друга страна, Tyr-MIF-1 засилва покачването на телесното тегло, индуцирано от многократни стресови стимули (D'Amore and Loizzo, 1999), което представлява опиоиден ефект. Изглежда, че способността на Tyr-MIF-1 да предизвиква опиоидни или антиопиоидни ефекти зависи, поне отчасти от наличните опиоидни рецептори (Zadina et al., 1992).

Опиоидни ефекти

При морски свинчета, неполучавали опиоиди, Tyr-MIF-1 се отнася като опиоиден агонист и понижава електрически предизвиканите контракции на тънко черво (Zadina et al., 1992). Способността му да свързва опиоидните рецептори съответства на силата на ефекта, като е налице селективен афинитет предимно към μ- и по-слабо към δ- и κ-рецепторите.

При понижаване на количеството на опиоидните рецептори Tyr-MIF-1 действа като антагонист на инхибиращите ефекти на опиатите т.е. проявява антиопиоидни ефекти.

Подобно двойнствено действие е обяснимо, ако приемем Tyr-MIF-1 за частичен агонист на μ-рецепторите с относително ниска вътрешна активност и афинитет (сравнен напр. с ендоморфините).

Tyr-MIF-1 подобно на други опиоиди, инхибира спонтанната активност на невроните на locus coeruleus у плъхове (Yang and Chiu, 1997).

2.1.3. Tyr-W-MIF-1

Изолиране

Първоначално Tyr-W-MIF-1 е изолиран от фронтална кора на човешки мозък (Erchegyi et al., 1992). Изборът на кора се основава на изследвания, показващи, че в ЦНС ефектите на MIF-1 и Tyr-W-MIF-1, както и концентрацията на местата за свързване на Tyr-W-MIF-1 са най-високи в кората (Zadina et al., 1982). Изследователите са

предполагали, че тези пептиди могат да имат терапевтично приложение. Година по-късно е бил изолиран и от говежди хипоталамус (Hackler et al., 1993) .

Метаболизъм

Tyr-W-MIF-1 се разгражда повече в митохондриите на мозъчната кора, отколкото в митохондриите на всички останали части на мозъка на плъх (Kastin et al., 1998). Подобни регионални разлики в метаболизма на Tyr-W-MIF-1 не се наблюдават при плазмените мембрани на синаптозомите. Изследвания показват, че разграждането на Tyr-W-MIF-1 в мишки е по-слабо, отколкото у плъхове (Kastin et al., 1998).

Рецепторно свързване

Места за Tyr-MIF-1**:** Tyr-W-MIF-1 се свързва с местата за Tyr-MIF-1, но не и с тези за Tyr-K-MIF-1. Опиоидите не се свързват към тези участъци (Zadina et al., 1990b).

Опиоидни участъци: По отношение на μ-опиоидния рецептор Tyr-W-MIF-1 е по-мощен в сравнение с Tyr-MIF-1.

Tyr-W-MIF-1 е 200 пъти по-селективен по отношение на μ- в сравнение с κ- и δ-опиоидните рецептори (Zadina et al., 1994). Свързващата му активност е по-ниска в сравнение с тази на класическите опиати. Tyr-W-MIF-1 се свързва както с μ_1-, така и с μ_2- подклас опиоидни рецептори (Zadina et al., 1996).

Антиопиоидни ефекти

Обратна регулация на опиоидния рецептор: Tyr-W-MIF-1 понижава в дозо-зависима степен индуцираната от морфина обратна регулация на μ- и δ- рецепторите в човешки невробластомни клетки (Harrison et al., 1998). Пептидът не променя рецепторния брой, така че вероятно се отнася като парциален агонист. Притежава по-ниска ефективност от морфина по отношение на μ-рецептора, като може да предотврати активността на морфина като агонист, без сам да притежава опиоидна активност. При по-високи дози обаче може да се съревновава с морфина и да прояви собствена опиоидна активност.

Опиоиден антагонизъм: Tyr-W-MIF-1 антагонизира морфиновата аналгезия (Gergen et al., 1996). Антагонизмът представлява дозо-зависимо антагонизиране на медиираната от супраспиналните μ_1-опиоидни рецептори аналгезия, което подсказва, че

тетрапептидът свързва μ_1–опиоидните рецептори, но не притежава достатъчно ефективност да индуцира аналгетичен отговор.

В тънко черво на морско свинче Tyr-W-MIF-1 се отнася като опиоиден антагонист (Erchegyi et al., 1992, 1993). В тези опити се прилага морфин 3 дена преди пептида. Получават се толеранс и зависимост, като се понижава опиоидният резерв. По този начин антиопиоидните ефекти на Tyr-W-MIF-1 се доказват по-лесно, както и за Tyr-MIF-1 (Zadina et al., 1992). В друг опит Tyr-W-MIF-1 инхибира действието на ниски, но не на високи концентрации μ-селективни опиоиди в невроните на *locus coeruleus* (Yang and Chiu, 1997).

Индуцираната от имобилизационен стрес антиноцицепция също се понижава от Tyr-W-MIF-1, измерено чрез *paw-pressure*-теста (Bocheva and Dzambazova-Maximova, 2004b). Антиопиоидният ефект е по-силен, когато тетрапептидът се инжектира след излагане на стрес. Tyr-W-MIF-1 също така понижава морфиновия аналгетичен ефект при тестовете *tail-flick* и *paw-pressure* (Bocheva and Dzambazova-Maximova, 2004a).

Опиоидни ефекти

Tyr-W-MIF-1 индуцира налоксон-обратима аналгезия след интрацеребро-вентрикуларно или интратекално въвеждане (Zadina et al., 1993; Gergen et al., 1996). Предполага се, че ефектът е медииран предимно посредством μ_2-механизъм, докато антиопиоидните ефекти са μ_1-медиирани (Fisher et al., 2006). Получение резултати са донякъде неочаквани, тъй като след интрацеребровентрикулното въвеждане на Tyr-W-MIF-1 супраспиналната аналгезия е предимно μ_1–медиирана, докато спиналната аналгезия след интратекално въвеждане е μ_2-медиирана.

Подобно на Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 също притежава опиоидни ефекти в тънко черво на морско свинче (Erchegyi et al., 1993). Тетрапепетидът инхибира електрически – индуцираните контракции, които са налоксон-обратими. При записи от неврони на *locus-coeruleus* Tyr-W-MIF-1 инхибира спонтанното им активиране, като предизвиква хиперполяризация на мембранния потенциал, което представлява опиоидно действие (Yang and Chiu, 1997).

Кръвно-мозъчна бариера

Tyr-W-MIF-1 се изнася от мозъка подобно на Tyr-MIF-1 (Banks et al., 1993). Всеки от двата пептида се конкурира за транспорта с другия, но ефектът на Tyr-MIF-1 върху

транспорта на Tyr-W-MIF-1 е по-силен от обратния вариант. Така Tyr-W-MIF-1 споделя същата система за излъчване от мозъка, както Tyr-MIF-1, но в по-слаба степен.

2.1.4. Tyr-K-MIF-1

Изолиране

Изолиран е от фронтална кора на човешки мозък (Hackler et al., 1994).

Рецепторно свързване

Места за свързване на Tyr-MIF-1**:** Подобно на Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1, Tyr-K-MIF-1 свързва участъците за Tyr-MIF-1, където традиционните опиати са неактивни (Hackler et al., 1994).

Места за свързване на Tyr-K-MIF-1**:** Tyr-K-MIF-1 притежава свое уникално свързващо място (Hackler et al., 1994), в което налоксонът, DAMGO, Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1 са без ефект.

Места за свързване на опиоиди**:** За разлика от Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1, както и други, съдържащи Tyr-Pro- пептиди (хеморфин, цитохрофин, морфицептин и др.) (Zadina et al., 1990b), Tyr-K-MIF-1 не свързва опиоидните рецептори в дози до 300 μM (Hackler et al., 1994).

Антиопиоидни ефекти

Tyr-K-MIF-1, подобно на други членове на семейството на Tyr-MIF-1, понижава аналгетичния ефект на морфина при интраперитонеално инжектиране 20 минути по-късно в доза от 1 мг/кг (Bocheva and Dzambazova-Maximova, 2004a).

Tyr-K-MIF-1 има антиопиоидно действие върху индуцираната от имобилизационен стрес антиноцицепция при инжектиране един час след стреса (Bocheva and Dzambazova-Maximova, 2004a, 2004b).

Опиоидни ефекти

При интраперитонеално въвеждане по време на или един час преди имобилизационен стрес Tyr-K-MIF-1 засилва аналгезията (Bocheva and Dzambazova-Maximova, 2004a, 2004b). Инжектиран самостоятелно, Tyr-K-MIF-1 индуцира дозо-

зависима краткотрайна аналгезия, която се премахва от налоксон (Zamfirova et al., 2007). Това предполага участие на хистаминергичната система.

Тъй като Tyr-K-MIF-1 е неактивен в тънко черво на морско свинче и не се свързва с опиоидните рецептори се предполага, че тетрапептидът повишава болковия праг чрез индиректно активиране на опиоидната система, което води до освобождаване на хистамин и стимулиране на постсинаптичните хистаминергични рецептори (Hackler et al., 1994; Zamfirova et al., 2007).

3. Стрес-индуцирана аналгезия

3.1. Същност

Стрес-индуцираната аналгезия (СИА) представлява вродена супресия на болковия отговор у бозайниците, която се проявява по време или след излагане на стресогенни или страхови стимули. Експерименталните постановки, проведени в тази насока, способстваха за изясняване на основните механизми на ноцицепцията и възможния терапевтичен потенциал на откритието.

3.2. Еволюционно развитие и генетична основа на стрес-индуцираната аналгезия

В исторически план болката се приема като еволюционно изработен защитен отговор спрямо неприятни или болезнени стимули. „Отрицателното” поведение (страх, напрегнатост, паника) или поведението за избягване на болката могат да се разглеждат като част от системата на организма срещу болкови въздействия (Bolles and Fanselow, 1980).

СИА може да се разглежда като част от синдрома *fight or flight*. Издържането на болка не би било полезно с оглед оцеляването на организма, след като е налице реална опасност от неговото увреждане и загиване. След преминаване на опасността повишената болкова перцепция се приема като благоприятна за оцеляването, тъй като нормалното поведение в случая би било нещадящо и може допълнително да навреди на индивида.

Отгледани са специални линии мишки с висока, респ. ниска, чувствителност на СИА. Открити са и фенотипни разлики, които се кодират от сравнително ограничен брой генетични локуси (Panocka et al., 1986; Panocka et al., 1991; Marek et al., 1993; Sadowski and Panocka, 1993; Mogil et al., 1995b, 1996a; Lutfy et al., 1996; Konarzewski et al., 1997;

Kest et al., 1999; Sadowski and Konarzewski, 1999; Blaszczyk et al., 2000; Lapo et al., 2003c; Sacharczuk et al., 2003, 2008).

Животните с висока чувствителност към СИА (ВЧ) показват и по-висока чувствителност към морфина и антагонистите на опиоидните рецептори, което показва по-голямо участие на ендогенната опиоидна система в сравнение с мишките с ниска чувствителност към СИА (НЧ) (Panocka et al., 1986, 1991; Marek et al., 1993; Sadowski et Panocka, 1993; Kest et al, 1999). Освен това ВЧ реагират по-силно при рязко подаване на силен звуков сигнал, проявяват по-висока податливост на мутагени след облъчване с гама-лъчи, по-чувствителни са към хипотермия; тяхната консумация на кислород при плуване в студена вода е по-ниска и др. (Mogil et al., 1996a; Konarzewski et al., 1997; Sadowski and Konarzewski, 1999; Blaszczyk et al., 2000; Lapo et al., 2003a, 2003b, 2003c; Sacharczuk et al., 2003, 2008). Потърсени са генетичните причини за подобни разлики.

След кръстосване на ВЧ-мишки с такива с висока чувствителност към морфин, при разпада се получава „обръщане” на ВЧ, както и свръх-ВЧ-мишки. При кръстосване на НЧ-мишки с такива, проявяващи ниска чувствителност към морфин, се получава „обръщане” на НЧ, както и свръх-НЧ-мишки. Данните подсказват, че морфиновата чувствителност и чувствителността към СИА се кодират от различни участъци (Mogil et al., 1995a).

Доказано е, че НЧ-мишки обикновено притежават по-високи мозъчни нива на иРНК, кодираща μ- и δ-опиоидни рецептори, в сравнение с ВЧ-мишки (Kest eal., 1999). Въпреки множеството фенотипни различия между ВЧ- и НЧ-мишки, само един или два участъка обуславят чувствителността към СИА, като различията се проявяват след едно поколение (Mogil et al., 1995b).

За пълното изчезване на СИА са необходими, от друга страна, над 21 поколения селективно отглеждане на животните (Mogil et al., 1996b). Следователно, генетичната основа на фенотипната изявя на стрес-индуцираната аналгетична чувствителност не е добре запазена, но фундаменталната генетична основа за проявата на СИА е добре запазена в генома на поколенията.

3.3. Модели на стрес-индуцирана аналгезия

Моделите за изучаване на СИА правят възможно разбирането на сложните физиологични механизми на болката, стреса и страха, като едновременно предлагат нови терапевтични цели за нарушенията, свързани с посочените явления.

За развитието на СИА са необходими два стимула – болков и стрес-стимул, който се развива по безусловно-рефлекторен механизъм или по условно-рефлекторен. В зависимост от този механизъм СИА се разделя на безусловно- и условно-рефлекторна.

3.3.1. Безусловно-рефлекторна СИА

Безусловно-рефлекторната СИА изучава поведението, което се явява вследствие на съществуващи безусловни рефлекси: плуване при поставяне на животното в топла или студена вода, поведението при имобилизация, при излагане на контакт с хищници, при „социален" конфликт, при излагане на травма, радиация, силен шум, при поставяне в нова непозната обстановка и др. Тези безусловни рефлекси индуцират аналгезия преди или по време на болковата стимулация, която може да включва: електрическо или фармакологично въздействие, радиация, топлина, ухапване от животно и др.

3.3.2. Условно-рефлекторна СИА

Условно-рефлекторната СИА може да се разглежда в контекста на инстинкта за оцеляване. Изразява се чрез супресия на болката при повторно поставяне на животното в условия, при които то вече е изпитвало болка, т.е. експериментално е създаден условен рефлекс. Опитните постановки включват многократно излагане на болкови стимули (ухапване, *footshock*, подаване на силна светлина, контакт с паяци на животни с развита арахнофобия и др.). Опитите показват завидна способност на животните за „социално" обучение (Harris and Westbrook, 1995; Finn et al., 2004).

3.4. Зависимост на СИА от физиологични фактори (пол, възраст) и от модела на изследване.

3.4.1. Зависимост от физиологични фактори

Доказани са полово-свързани различия в експресията на СИА. При мъжките индивиди се наблюдава по-силно изявена СИА в сравнение с женските индивиди на същия вид (Romero and Bodnar, 1986; Bodnar et al., 2002). При кастрирани мъжки индивиди се наблюдават характерните за женските индивиди на вида нива на аналгезия, което показва ролята на половите хормони в опосредстването на половите различия (Romero et al., 1987). Същите опити подсказват и че ролята на опиоидната сиситема в медиацията на СИА е полово-специфична (Romero et al., 1988). Освен това СИА при женските индивиди е зависима както от естрогеновия цикъл, така и от модела на СИА.

По време на естрогеновата фаза се наблюдава значително намаление на опиоидната компонента на СИА, но незначително понижение на неопиоидната компонента в сравнение с останалите фази на цикъла (Ryan and Maier, 1988). Същите автори доказват и че СИА при женските индивиди зависи от изявата на яйчниковите хормони, защото при овариектомирани животни се наблюдава редукция на опиоид-зависимата СИА, като приемът на естрогени премахва този ефект.

Следователно, и при мъжките, и при женските индивиди могат да се наблюдават различия в изявата на СИА в зависимост от нивата на половите хормони. Това е наложило в практиката употреба предимно на индивиди от мъжки пол с оглед стандартизация при рутинните изследвания на СИА.

Изявата на СИА се повлиява и от възрастта, както и от предишния опит на индивида. Съществуват данни за развитие на аналгезия вследствие потапяне във вода на плъхове на възраст до 3 дена и значимото й повишаване до 17-ия ден (Stolberg and Frenk, 1995). Предполага се, че повишението се дължи на развитие на десцендентно инхибиране на болката. Толерантност към СИА се развива по-лесно у по-млади индивиди (до 4-месечна възраст), отколкото след 15-16^{ия} месец (Girardot and Holloway, 1985).

По отношение зависимостта на СИА от опиоидната система, съществуват противоречиви данни. Според някои автори възрастовите различия не са опиоид-медиирани (Onodera et al., 2001), според други – не-опиоид-медиираната СИА, която се потенцира след адреналектомия, не е възрастово-специфична (Hamm et al., 1986; Hamm and Knisely, 1987). Проведени са и опити с доброволци, при които се наблюдава намаляване на СИА с възрастта (Washington et al., 2000).

3.4.2. Зависимост на СИА от модела на изследване

Проведените опити показват, че не всички болкови стимули се обработват в централната и периферната нервна система по еднакъв начин; не всички застрашаващи индивида ситуации могат да индуцират аналгетичен отговор, а някои дори опосредстват хипералгезията. Резултатите се различават в зависимост от опитните постановки – остра болка или хронична болкова стимулация (Craig, 2006).

Оказва се, че животните с хронична болкова стимулация имат по-остра реакция при поставяне в стресова ситуация (Rivat et al., 2007). При деца, които са под постоянен стрес в резултат на чести пристъпи на абдоминална болка, СИА е по-слабо проявена (Dufton et al., 2007).

Трудностите при изучаване на СИА се свързват с разлики между отделните опитни постановки, както и с възможни въздействия на допълнителни фактори, като напр. промени в микроциркулацията при опити с температурни въздействия (Eide and Tjølsen, 1988; Garcia et al., 2001; Blessing, 2003; Vianna and Carrive, 2005; Benoist et al., 2008).

Както вече бе показано СИА не възниква в резултат на всякакви застрашаващи стимули – някои дори повишават ноцицепцията. Допълнително значение има фактът дали болката се очаква или болковият стимул е внезапен (Ploghaus et al., 1999, 2001). Счита се, че очакването на болка, без да се знае кога точно ще се прояви, води до поява на напрежение, което води до възприемане на дразнителите като болезнени; обратно, страхът от очаквано конкретно болезнено въздействие води до възникване на СИА (Rhudy and Meagher, 2000, 2001; Meagher et al., 2001).

Сложността при изследване на СИА при човека се дължи отчасти на способността за трениране на сензорната перцепция. Мотивацията и способността за самообучение за потискане на болката се различава между отделните индивиди. Някои хора изпитват гордост от способността им да понасят болка.

Вариацията в болковата перцепция между индивидите би могла да заблуди изследователите, изучаващи СИА при хората. Освен това, човекът може да предвиди болковия стимул и това да се отрази върху субективното усещане за болезненост. Наред с това съществуват и етични пречки при експериментите с хора. Участниците в подобни опити са наясно за естеството на опита и вида усещане, за разлика от опитите с животни. Следователно тук се намесват физиологични и генетични различия, като страхът от болката се различава между отделните индивиди (Mogil et al., 1996b; Calder et al., 2001; Tracey et al., 2002).

Индивидуални разлики съществуват, в известна степен, при всички видове, които проявяват СИА. Това налага по-широк брой опитни единици в отделните групи. Наред с това е необходимо стресът, сам по себе си, да не причинява болка.

3.5. Дифузен инхибиторен контрол на болката (ДИКБ)

Дифузният инхибиторен контрол на болката (ДИКБ) предполага силна инхибиция на невроните в задния рог на гръбначния стълб, когато се прилага болезнен стимул в която и да е част на тялото (Dickenson et al., 1981). Проявява се с понижение на усещането за болка след приложена болкова стимулация в определена част на тялото по време или след приложена друга болкова стимулация в друга част на тялото.

Следователно ДИКБ споделя концептуални сходства със СИА и някои модели на СИА включват излагане на болкови стимули, последвано от изследване на отговора към допълнителни болкови стимули. Подобно на СИА, ДИКБ е доказан при плъхове (Dickenson et al., 1981), както и при хора (Chen et al., 1985; Talbot et al., 1989; Le Bars et al., 1992).

Макар да съществуват припокриващи се механизми, медииращи ДИКБ и СИА, тези два феномена се различават на невроанатомично ниво. ДИКБ се медиира първично на гръбначно-мозъчно ниво (Dickenson and Le Bars, 1987). Повечето проведени опити не доказват участие на мозъчни участъци, които имат ключова роля при СИА: *PAG* (Bouhassira et al., 1992b), ростралната вентромедиална медула (Bouhassira et al., 1993), *locus coeruleus* (Bouhassira et al., 1992a). За разлика от това е доказано участие на каудалната медула в съседство с гръбначния мозък (Bouhassira et al., 1995), лезии на която значително понижават ДИКБ (Bouhassira et al., 1992a).

Подобно на СИА съществуват доказателства за ролята на опиоидната система (Le Bars et al., 1987; Bouhassira et al., 1995; Willer et al., 1990) в ДИКБ.

Следователно, въпреки че тези две форми на ендогенна аналгезия са невро-анатомично разграничими, възможно е, в известна степен, конвергиране на ниво невротрансмитери/невропептиди.

„Теорията за специфичността”, предложена от Рене Декар през XVII в., постановява, че интензитетът на болката и тъканното разрушение са пряко свързани. Тази теория е била приемана в продължение на много години, макар че болката може да се модулира от множество фактори, в т. ч. опита и емоционалното състояние. Възникването на т. нар „фантомна болка” след ампутация на крайник подкрепя становището.

Предложената от *Melzack* и *Wall* през 1962 г. теория за „*gate-control*”-[a] на болката приема, че последната се контролира в резултат взаимодействието между множество неврони на ниво гръбначен мозък, а не чрез директно активиране на болковите рецептори. Тази теория преполага, че *Aβ*-влакната, които не са свързани с болковата перцепция, образуват синапси заедно с *Aδ*- и *C*-влакната (Melzack and Wall, 1965). По време на предаване на импулси по *Aβ*-влакната пътят за предаване на болката се прекратява – „вратата е затворена” за ноцицептивните сигнали. Обратното също е вярно – по време на силно активиране на ноцицептивните влакна се инхибира трансмисията на не-болковите сигнали – „вратата е отворена” за болковата перцепция. Тази теория представлява значим напредък в разбирането на болковата регулация. Но едва след

интегрирането й със знанията за десцендентните пътища за ноцицептивна регулация започна да се мисли сериозно за супраспинална модулация на болката (Mayer et al., 1971; Mayer and Price, 1976; Lopez et al., 1991).

Супраспиналната регулация на болката може да включва както усилване на ноцицепцията, известно като „десцендентно улеснение" (Willer et al., 1979), така и намаляване на ноцицепцията, известно като „десцендентно инхибиране" (Mayer et al., 1971). Интерес представлява фактът, че в някои случаи анатомичните субстрати и области, участващи в улесняването, са идентични с тези на инхибирането на ноцицепцията. Различията в механизмите на това двупосочно повлияване се дължат основно на рецепторни подтипове, отключващи различни вътреклетъчни механизми (Millan, 2002). Така пътищата на ниво гръбначен мозък, описани в теорията за „вратата на контрола", и супраспиналните десцендентни инхибиторни пътища за болка имат съвместно участие в медиацията на СИА (Madden et al., 1977; Watkins and Mayer, 1982; Grau, 1987; Grau et al., 1990; Meagher et al., 1990; Meagher et al., 1993; Rhudy et al., 2004).

Първичните аферентни неврони в или около епидермиса отчитат болкови стимули, които по своя характер могат да бъдат химични, температурни или механични. След това ноцицептивната информация се проектира и предава към задните рога на гръбначния мозък. Следва нейното предаване към главномозъчната кора – директно или индиректно, посредством мозъчния ствол, средния мозък, таламуса, като в тези случаи участват т. нар. асцендентни болкови пътища (Millan, 1999). Десцендентните болкови пътища започват от мозъчната кора или от хипоталамуса и завършват на ниво гръбначен мозък (Millan, 2002). Освен това коровите мозъчни неврони предават също така ноцицептивна информация към амигдалата, хипоталамуса или директно към *PAG*.

3.6. Участие на специфични мозъчни структури в СИА

Съществуват доказателства за участието в СИА на специфични мозъчни области. Тези доказателства са получени посредством експерименти, използвали образна и сетивна стимулация, предизвикване на лезии, приложение на неспецифични блокери на синапсите за изясняване на ролята на отделните мозъчни участъци.

3.6.1. Мозъчна кора

Невроните в първичната соматосетивна мозъчна кора реализират дискриминация между отделните ноцицептивни сигнали (Libet, 1982). Невроните в медиалния

префронтален кортекс определят интензитета на стимула (Zhang et al., 2004). Префронталната кора участва също така в запазването или изключването на спомени, свързани със страхови преживявания във връзка с преживяна болка (Hugues et al., 2004). Стимулиране на някои участъци, напр. цингулума, понижава поведението, свързано с болка (Fuchs et al., 1996). Подобен ефект се наблюдава след стимулация на медиалния префронтален кортекс, но не и след стимулация на окципиталната и малкомозъчната кора (Hardy, 1985). Стимулиране на окципиталната кора води до умерено повишаване на болковия праг в някои опитни постановки (Oleson et al., 1980). Следователно директното активиране на кортикалните мозъчни области модулира понижението на ноцицепцията, подобно на наблюдаваното при СИА.

Лезии на фронталната кора премахват СИА след краткотрайни, но не след продължителни болкови стимули (Meagher et al., 1989). Билатерални лезии на вентролатералната орбитална кора занижават инхибицията на болката от високочестотна електроакупунктура при опити с плъхове (Lu et al., 1996). Горепосочените промени не се наблюдават при нискочестотна акупунктура. Както ниско-, така и високочестотната акупунктура повишават прага за топлинни болкови въздействия (Zhang et al., 2003a). Открива се положителна корелация между аналгетичния ефект и активността на ипсилатералната кора на цингулума. При прилагане на болков стимул чрез ниска температура и последваща електроакупунктура е наблюдавана повишена активация билатерално на вторичната соматосензорна област, медиалната префронтална кора и 32-ро поле по Бродман, наред с понижена активация на първичната соматосензорна кора, 7-мо и 24-то поле по Бродман (Zhang et al., 2003b). При опити с доброволци са били използвани зрителни сигнали за отвличане на вниманието, при което е отчетено понижение на болковия интензитет и усета за „неприятно” след прилагане на висока температура като болков стимул (Valet et al., 2004). Ефектът корелира с повишаването на активацията на орбитофронталната кора на цингулума при обекти, при които вниманието не е било отвличано. Следователно орбитофронталната кора улеснява аналгезията чрез взаимодействие с PAG, тъй като болковите състояния без отвличане на вниманието не показват повишение на активността в тези участъци.

3.6.2. Хипокамп

Изследванията за ролята на хипокампа в СИА са малко. Сигурно е участието му както в болковата медиация, така и в стресовите реакции (Maren, 2001; McEwen, 2001). Показано е участието на холинергичната, опиоидергичната и ГАМК-ергичната медиация

в ноцицептивната трансмисия (Favaroni Mendes and Menescal-de-Oliveira, 2008). Лезии в областта на вентралния хипокамп на новородени плъхове нарушават в дългосрочен план ноцицептивното предаване, като се наблюдава увеличена латентност (Al Amin et al., 2004). Доказана е ролята на хипокампа в страховия отговор, като е отчетена зависимост от: вида на увредената област, времето на нанасяне на лезията, вида на изследваната реакция на страх – поява, изява, утвърждаване, повторно затвърждаване, изчезване (Kim and Fanselow, 1992; Kim et al., 1995; Fanselow, 2000; Maren, 2001; Matus-Amat et al., 2004; Hobin and Maren, 2006; Lehmann et al., 2007; Sutherland et al., 2008).

Септо-хипокампалната система е активно ангажирана в невротрансмисията на ноцицепцията (Aloisi, 1997). Лезии на вентромедиалния септум понижават СИА и страхово-предизвиканата аналгезия (Kelsey and Baker, 1983). Стимулиране на структурата повишава прага към някои болкови стимули (Zhang et al., 2003a). Засега обаче липсва конкретно изследване за ролята на хипокампа в СИА, въпреки явното му участие в болковата перцепция и стресовите реакции.

3.6.3. Амигдала

Доказана е ключовата роля на амигдалата в медиацията на безусловно- и условно-рефлекторните страхови реакции, болковата сигнализация и СИА. В зависимост от стимулирания участък амигдалата може да доведе както до усилване, така и до отслабване на болковия усет (Lico et al., 1974). Детайлизирани изследвания доказват, че електрическата стимулация на амигдалата понижава ноцицепцията при формалиновия тест при плъхове (Mena et al., 1995); също така понижава болката при дразнене на зъбна пулпа при котка (Kawarada et al., 1996).

Лезии на централната част на амигдалата понижават безусловно-рефлекторната СИА (Werka and Marek, 1990; Werka, 1994, 1997). Тези лезии понижават и страхово-предизвиканата аналгезия (Helmstetter, 1992; Watkins et al., 1993). Но има данни, че безусловно-рефлекторната СИА у плъхове не се повлиява от лезии на амигдалата, което противоречи на друго изследване, където билатерални увреждания на амигдалата понижават СИА, т.е. потвърждават значението ѝ (Fox and Sorenson, 1994). Допълнителни изследвания сочат, че амигдалата е важна при СИА, като в случаите на увреждане на амигдалоидния комплекс се отчита понижение на аналгезията, индуцирана от принудително плуване в студена вода при плъхове (Pavlovic et al., 1996). Всички тези данни подсказват, че амигдалата медиира СИА при практически всички видове стрес.

При доброволци е отчетена обратна зависимост между аналгезията и активността на невроните на контралатералната амигдала при болков стимул от висока температура (Zhang et al., 2003a).

Амигдалата получава ноцицептивни стимули от първичната соматосетивна кора и може както да предава, така и да приема болкова информация от *PAG* в средния мозък (Helmstetter et al., 1993).

3.6.4. Periaqueductal grey (PAG)

Невроналните проекции на PAG медиират СИА като модулират нежелани и болкови сигнали. Директното стимулирне на PAG елиминира отговора към различни болкови стимули (електрошок, убождане, лъчиста енергия и др.) (Mayer and Liebeskind, 1974). Наблюдавана е значима редукция на болковия отговор след стимулация на PAG (Dennis et al., 1980). Данните подсказват, че PAG е важен компонент на десцендентния инхибиращ болката път.

Лезии на дорзалния или вентралния PAG водят до отпадане на антиноцицепцията в модел на страхово-индуцирана аналгезия (Helmstetter and Tershner, 1994).

Доказана е повишена транскрипция на ранния ген *c-fos* в PAG у плъхове, при които се комбинира подаване на болков стимул с електоакупунктура, в сравнение с плъхове, получили само болкова стимулация (Zhou and Zhou, 1993).

Антиноцицептивната активност на PAG се обуславя от проекциите й към катехоламинергични клетъчни групи в моста и медулата, които на свой ред инервират дорзалния рог на гръбначния мозък (Bajic and Proudfit, 1999), както и проекции към хипоталамуса (Behbehani et al., 1988).

3.6.5. Хипоталамус

Директната стимулация на задния хипоталамус има мощен аналгетичен ефект, което предполага ролята му в десцендентния инхибиращ болката път (Rhodes and Liebeskind, 1978). Директна стимулация на преоптичния и латералния хипоталамус предизвиква аналгезия (Cunningham et al., 1986; Lopez et al., 1991).

Лезии на *nucl. arcuatus* на хипоталамуса понижават СИА у плъхове (Millan et al., 1980a). По-нататъшните данни обаче са противоречиви – 4 дена след нанасяне на лезията се наблюдава понижение на СИА, но в зависимост от вида СИА, 2 седмици по-късно са възможни както понижаването (на опиоидната СИА), така и потенцирането (на не-опиоидната СИА) (Kelsey et al., 1986). Хипоталамичните лезии резултират в понижена

СИА след принудително плуване в студена вода при плъхове и мишки (Tejwani and Richard, 1986; Truesdell and Bodnar, 1987). Лезии на *nucl. paraventricularis* на хипоталамуса нямат ефект върху болковия отговор след имобилизационен стрес (Fuchs and Melzack, 1996). Следователно, отделните области на хипоталамуса имат различно значение за отговора на болкова стимулация.

Различни опитни постановки доказват участие в СИА на *PAAC* (Haulica et al., 1986), активация на *хипофизо-адреналната ос* (Filaretov et al., 1995; Filaretov et al., 1996), *окситоцин-ергична медиация* (Robinson et al., 2002), *орексин-зависима антиноцицепция* (Watanabe et al., 2005), участие на *вазопресина* при интраперитонеално инжектиране на солеви разтвор (Wright and Lincoln, 1985), както и след ограничен прием на храна (Wideman et al., 1996). Доказано е и участието на други хормони и биологично-активни субстанции – лутеинизиращ хормон, пролактин, невротензин (Seta et al., 2001; Gui et al., 2004). Данните показват, че по време на СИА се активират различни участъци на хипоталамуса, като всеки от тях притежава собствен източник на модулаторни невропептиди.

3.6.6. Мозъчен ствол

Проекциите на мозъчния ствол към гръбначния мозък представляват част от десцендентния инхибиращ болката път (Basbaum and Fields, 1979). Доказано е и участие на еферентна антиноцицептивна проекция от мезо-диенцефалното съединение (Peschanski and Manthyh, 1983). Хипоталамусът предава информация към PAG или ростровентралната медула, които имат отношение към болковата модулация (Aimone et al., 1988; Behbehani et al., 1988; Cecchetto and Saper, 1988). Невроните на PAG предават информацията към области на мозъчния ствол – ростровентралната медула, парабрахиалното ядро, *nucl. tractus solitarii* (Lewis et al., 1987; Thurston and Randich, 1992; Yoshida et al., 1997). Ростровентралната медула инхибира еферентната ноцицептивна трансмисия към гръбначния мозък (Fields and Heinricher, 1985; Heinricher et al., 1989) чрез опиоид-зависими механизми (Heinricher et al., 1994). Именно области в мозъчния ствол се проектират към задния рог на гръбначния мозък, където се реализира терминалната фаза на инхибирането на болковата перцепция по време на СИА. Отбелязано е повишение на транскрипцията на ранния ген *c-fos* в ростралната вентрална медула след акупунктура, в сравнение с контролна група, получила само болкова стимулация (Zhou and Zhou, 1993), което показва активиране на участъка при описаните обстоятелства.

3.6.7. Гръбначен мозък

Ранните изследвания чрез лезии или напречни секции на гръбначния мозък показват, че десцендентното инхибиране на болката от областта на предните лапи при плъха се медиира от *funiculus dorsolateralis* на гръбначния мозък, докато СИА в областта на задните лапи се медиира от супраспинални или независими от гръбначния мозък пътища (Watkins et al., 1982; Watkins and Mayer, 1982).

В отговор на болков стимул се отделя *substancia P* в задния рог на гръбначния мозък. При плъхове с дефект на рецептора за субстанцията се отчита по-слаба аналгезия след принудително плуване, придружено с болкова стимулация (De Felipe et al., 1998). По време на възпаление се получава адхезия на лимфоцити към клетките на задния рог на гръбначния мозък. От тези лимфоцити се отделя *β*-ендорфин (Cabot et al., 1997). След приложение на антитела срещу адхезионните молекули, опосредстващи адхезията, се наблюдава понижение на СИА спрямо механични и термични стимули след принудително плуване в студена вода (Hua et al., 2006).

Промяна на аналгезията се наблюдава и в случаите на отсъствие на окситоцин (Robinson et al., 2002). Подобен ефект се наблюдава при приложение на окситоцинови антагонисти.

Отчетена е понижена експресия на *c-fos* в гръбначния мозък на плъхове, изложени на стресова ситуация с последващ болков стимул. Подобен ефект не е отчетен при контроли само с болкова стимулация (Bolles and Fanselow, 1980), което свидетелства за понижена невронална активност в посочените области по време на СИА, в сравнение с епизоди само на болкови стимули.

3.7. Неврохимизъм на СИА

Различията в механизмите на десцендентно улеснение, респ. инхибиране, на ноцицепцията се основават предимно на активиране на рецепторни субтипове, свързани с различни вътреклетъчни механизми за предаване на сигнала (Millan, 2002). Невротрансмитерите или невропептидите, които могат както да улеснят, така и да инхибират ноцицепцията, включват серотонин, норадреналин, допамин, динорфин, ацетилхолин, азотен оксид (Akil et al., 1972; Behbehani, 1982; Cruz and Basbaum, 1985; Hatakeyama et al., 1996).

Някои невротрансмитери имат преобладаващо действие – или инхибират, или потенцират ноцицепцията. Предимно улесняващи ноцицепцията невротрансмитери са

възбудните аминокиселини глутамат, хистамин, холецистокинин, меланокортин, простагландините (Juan, 1981; Faris et al., 1983; Xu et al., 1995; Vrinten et al., 2000). Предимно инхибиращ ефект притежават ГАМК, глицин, вазопресин, окситоцин, аденозин, ендогенните опиоиди, ендоканабиноидите (Le Bars et al., 1980; Zhang et al., 1982; Bernatzky et al., 1983; Sivam and Ho, 1983; Garcia-Arraras et al., 1986; Nakamura et al., 1997; Smith et al., 1998).

Ноцицептивната трансмисия и медиацията на СИА зависят от промени в нивата на невротрансмитерите в отделните мозъчни области, от възможността на тези трансмитери да свързват своите рецептори, както и от колебанията в свързващия капацитет на отделните рецепторни субтипове.

3.7.1. Медиация и модулация на СИА чрез опиоидната система

Изучаването на механизмите на СИА започва с изясняване ролята на ендогенните опиоидни пептиди и техните рецептори. В тази насока са проведени множество изследвания, както и за уточняване на мозъчните участъци, свърани с опиоидната сигнализация.

Векове наред е познат и използван морфинът, който реализира своя противоболков ефект чрез активиране на опиоидната система. През 70-те години на XX в. е открито, че стимулирането на PAG предизвиква ефект, сходен с морфиновия – това подсказва наличие на ендогенни опиоидни вещества (Akil et al., 1972).

Скоро след това са разкрити опиоидните рецептори и техните ендогенни лиганди (Akil et al., 1984). Към днешна дата са известни няколко основни групи опиоидни рецептори – μ, δ, κ, λ и σ. Ендогенните опиоиди включват динорфини, енкефалини и ендоморфини. Всички споменати рецептори са метаботропни и свързването на лиганда води до инхибиране на аденилатциклазата (Ho et al., 1973; Naito and Kuriyama, 1973).

Доказано е, че опиоидната система медиира СИА (Akil et al., 1986; Amit and Galina, 1986). Изследванията потвърждават ролята на опиоидите, както и блокирането на техния аналгетичен ефект след приложение на антагонисти на опиоидните рецептори – напр. налоксон (Akil et al., 1976). По-късни опити доказват, че налоксонът повишава отговора към болкова стимулация (Fanselow and Bolles, 1979). Прилагане на тиорфан - инхибитор на енкефалиназата, потенцира както продължителността на СИА, така и върховия ефект, който се блокира от налоксон (Chipkin et al., 1982; Greenberg and O'Keefe, 1982). Опитите показаха, че непосредствено след поставяне на опитните животни при неблагоприятни (стрес-) условия, се наблюдава бързопреходен аналгетичен

ефект, независимо от приложението на опиоидни антагонисти; последните обаче блокират продължителната аналгезия (Harris and Westbrook, 1994).

Допълнително е изяснена зависимостта на СИА от вида на опитната постановка – предна/задна лапа на плъх (Watkins et al., 1982), интермитиращо/постоянно дразнене (Lewis et al., 1980). Данните сочат, че ендогенните енкефалини обуславят толерантността към болката, но не индуцират аналгезия (Urca et al., 1983). В модел на страхово-индуцирана аналгезия е отчетено значително понижение на β-ендорфиновите нива в хипофизата и хипоталамуса на плъхове, подложени на кондициониран стрес, но и сигнификантно повишение на плазмените им нива в сравнение с контролите, неизложени на стрес (Przewlocka et al., 1990).

При опити с доброволци след създаване на рефлекс за асоцииране на звуков сигнал с математически изчисления и бял шум, повторно излагане на звуковия сигнал повишава болковия праг и толерантността; описаните ефекти се понижават от налоксон (Flor et al., 2002).

При плъхове с генетична делеция на прекурсорната молекула на β-ендорфина (проопиомеланокортин) не се наблюдава СИА, докато делецията на *Met*-енкефалина не повлиява експресията й (Kieffer, 1999; Rubinstein et al., 1996). Следователно β-ендорфинът има по-значима роля от *Met*-енкефалина при изявата на СИА. Трансгенни мишки, при които липсват μ- и δ-опиоидните рецептори, също не експресират СИА (Contet et al., 2006).

Ендогенната опиоидна система е изучавана в контекста на циркадните вариации на СИА, като са отбелязани флуктуации в освобождаването на ендогенни опиоидни пептиди (Puglisi-Allegra et al., 1982). Максимумът на СИА за мишки е отчетен през нощта (Kavaliers and Ossenkopp, 1988). Привикването към имобилизационно-индуцирана аналгезиа е по-лесно през нощта, отколкото през деня, макар и степента на аналгезията да не се променя в зависимост от периода в денонощието (Miller, 1988). Морфин-индуцираната аналгезия, отчетена чрез *tail-flick*-теста, се потенцира от имобилизация през нощта, но не през деня.

Има доказателства, че хипофизата (Lewis et al., 1980; Millan et al., 1980b) или ЦНС (Lewis et al., 1981) синтезират опиоиди по време на СИА. Опиоидните рецептори модулират функцията на вентролатералния PAG по време на страхово-индуцираната аналгезия. Приложение на налтрексон (антагонист на μ-рецептора) във вентролатералния PAG понижава степента на страх-индуцираната аналгезия (Helmstetter and Landeira-Fernandez, 1990). След имобилизационна СИА се отчита понижение на *Met*-

енкефалино-подобната имунореактивност в мезолимбичната област, стриатума, хипоталамуса, таламуса, префронталната кора, амигдалоидните ядра, пириформената кора (Kurumaji et al., 1987).

СИА, индуцирана вследствиа социален конфликт, води до понижение на *β*-ендорфино-подобната имунореактивност в PAG (Kulling et al., 1988). Доказано е, че индивидуални различия в базовите стойности на *β*-ендорфино-подобната имунореактивност в PAG корелират с експресията на високи, респ. ниски, стойности а СИА (Kulling et al., 1989).

В модел на страх-индуцирана аналгезия (СтИА), утвърждаването на условен страх както и експресията на страх-индуцираната аналгезия се нарушават от едностранно инжектиране на морфин в амигдалата (Good and Westbrook, 1995). У плъхове СтИА се атенюира при блок на синтеза на *μ*-опиоидни рецептори в ростралната вентромедиална медула (Foo and Helmstetter, 2000).

СИА се понижава след интратекално въвеждане на рецепторни антагонисти на *μ*- и *κ*-, *μ*- и *δ*- или комбинация срещу трите подвида рецептори (Watkins et al., 1992). Наред с това се оказа, че *G*-протеин, чувствителен на токсина на пертусиса, и *G*-протеин за обратно регулиране на калиевите канали представляват безусловно важни медиатори на опиоид-медииираната СИА (Parolaro et al., 1991; Blednov et al., 2003).

Възможно е антиноцицептивният ефект от активирането на опиоидните рецептори поне отчасти да е свързан с освобождаване на инхибиторната аминокиселина ГАМК и възбудната глутамат (Sherman and Gebhart, 1974; Ho et al., 1976; Christie et al., 2000).

3.7.2. Модулация на СИА чрез ендоканабиноидната система

Модулацията на мозъчната функция и синаптичната ефективност от страна на ендоканабиноидите се опосредства от процес, известен като ретроградно сигнализиране. При този вид сигнализиране невротрансмитерът или „сигнализиращият посредник” се освобождава от постсинаптичния неврон и упражнява своя ефект пресинаптично (Wilson and Nicoll, 2001). Подобно ендоканабиноид-медиирано ретроградно сигнализиране се реализира в областите на мозъка, където протича стрес-отговорът – хипокамп, амигдала, PAG, ростро-вентрална медула, спинално ядро на *n. trigeminus*, части на гръбначния мозък (Lichtman et al., 1996; Meng et al., 1998; Jennings et al., 2001; Katona et al., 2001; Wilson and Nicoll, 2001).

Доказано е, че ендоканабиноидната система модулира реакциите на страх (Marsicano et al., 2002), болка (Fride and Mechoulam, 1996), СИА (Valverde et al., 2000; Finn et al., 2004; Hohmann et al., 2005; Vaughan, 2006).

При нарушения на канабиноидните рецептори не се наблюдава аналгезия след стресови ситуации (Valverde et al., 2000). Приложение на антагонисти на CB1-рецептора, напр. римонабант, понижава СтИА (Finn et al., 2004). Отчетено е повишение на анандамида и 2-АГ в базолатералната амигдала при проява на условен страх (Marsicano et al., 2002), което предполга, че ендоканабиноидната система в този участък на мозъка може да медиира СИА.

Директно приложение на антагонист на CB1-рецептора в базолатералната амигдала понижава СИА (Connell et al., 2006). Други опити сочат, че антагонисти на CB1-рецепторите в дясната базолатерална амигдала не променят отчетената антиноцицепия в модел на СтИА, но понижават ноцицептивния отговор след формалинов тест на задна лапа на плъх без предшестващо страхово кондициониране (Roche et al., 2007).

Изглежда, че CB1-рецепторите в базолатералната амигдала имат различен принос при СИА в зависимост от вида стрес (условен/безусловен), както и според болковия стимул (*tail-flick*/формалинова инжекция). Директно инжектиране на агонисти на CB1-рецептора в PAG сигнификантно понижава стресовото и болково поведение, вероятно поради активация на десцендентни инхибиторни пътища (Finn et al., 2003), докато инжектиране на антагонист на КР директно в дорзалния PAG предотвратява развитието на не-опиоид-медиирана СИА (Hohmann et al., 2005). Фармокологичното потискане на ензимите, разграждащи анандамида и 2-АГ, респ. МКАХ и моно-ацил-глицерол-липаза, в PAG потенцира СИА, посредством механизми, зависими от КР (Hohmann et al., 2005). Интратекално въвеждане на инхибитори на горепосочените ензими потенцира стойностите на СИА (Suplita et al., 2006).

В резултат на други опити се стига до извода, че ендоканабиноидите на ниво гръбначен мозък модулират, но не медиират СИА. Съществуват данни в подкрепа на твърдението, че ендоканабиноидите и невропептидът холецистокинин си взаимодействат при експресията на СИА (Kurrikoff et al., 2008).

Последни данни показват, че основната нервно-ендокринна компонента на стрес-отговора – хипоталамо-хипофизо-надбъбречната ос е под ключовия контрол на ендоканабиноидите, както по отношение на базалното си ниво, така и по отношение на фината регулация на стрес-отговора (Finn, 2010).

Проведени са множество изследвания с трансгенни мишки, при които липсват канабиноидни рецептори (Barna et al., 2004; Haller et al., 2004a; Uriguen et al., 2004; Fride et al., 2005;Wade et al., 2006; Cota et al., 2007).

Заключенията на различните екипи сочат, че е налице покачване на иРНК за кортикотропин-освобождаващия фактор (КОФ) в *nucl. paraventricularis* на хипоталамуса, понижение на иРНК за глюкокортикоидния рецептор в хипокампа и статистически достоверно по-високи нива на АКТХ от хипофизата в сравнение с интактни животни.

Посочените централни промени се съпътстват от повишени нива на кортикостерон и АКТХ в плазмата в началото на тъмния цикъл и нарушен отрицателен ***feed-back*** на ниски дози дексаметазон (Cota et al., 2007). Допълнително е доказано, че острото системно приложение на CB1-рецепторния антагонист/обратен агонист римонабант (*SR141716*) повишава нивата на циркулиращия кортикостерон при гризачи (Patel et al., 2004; Wade et al., 2006; Steiner et al., 2008a; Steiner and Wotjak, 2008).

Всичко това подчертава, че ХХН ос е под тоничния инхибиторен контрол на CB1-рецепторите и следователно на ендоканабиноидите.

4. Взаимодействие между ендоканабиноидната и опиоид-ергичната системи

Приложение на селективни антагонисти както на КР (Finn et al., 2004), така и на опиоидните рецептори (Fanselow et al., 1989) изцяло премахва СтИА. Защо обаче поне част от аналгезията не се запазва, след като само част от рецепторите се блокират? Най-логичното обяснение би било, че ендоканабиноидната и опиоидната системи участват съвместно по механизъм, изискващ едновременната сигнализация чрез опиоидните и КР. Има достоверни доказателства за синергично действие между двете системи по време на модулацията на ноцицептивното поведение (Cichewicz and McCarthy, 2003). Доказана е необходимостта от физиологично взаимодействие между опиоидната и канабиноидната системи за развитие на опиоид-медиирания отговор на стрес (Valverde et al., 2000). Инхибирането на ендоканабиноидния катаболизъм потенцира експресията на СтИА (Butler et al., 2008). Доказано е също така, че описаното потенциране се блокира от антагонисти на CB1-, CB2- и опиоидните рецептори, което подсказва взаимодействие между опиоидната и ендоканабиноидната системи при медиацията на СИА.

Опиоидите и канабиноидите представляват две отделни групи психоактивни вещества, но притежават някои сходни ефекти: индуцират каталепсия, хипотермия,

хипотензия, понижават локомоторната активност, предизвикват седация, имуносупресия и аналгезия (Manzaneres et al., 1999; Massi et al., 2001; Varvel et al., 2004).

Опиоидни субстанции като морфина се предписват като аналгетици при някои форми на хронична болка или такава със злокачествен произход, но аналгетичните възможности на Δ9-тетрахидроканабинола, основната психоактивна съставка на марихуаната, до този момент не са изцяло изучени.

В експерименти с парентерално или системно приложение при остра и хронична невропатична болка Δ9-ТХК и някои синтетични канабиноиди проявяват до 10 пъти по-висока аналгетична активност в сравнение с тази на морфина (Johnson et al., 1981; Lichtman and Martin, 1997; Fuentes et al., 1999; Fox et al., 2001).

Анатомично е доказано сходство в разположението на канабиноидните и μ-опиоидните рецептори в задния рог на гръбначния мозък (Welch and Stevens, 1992; Hohmann et al., 1999; Salio et al., 2001), както и в някои структури на ЦНС: *putamen*, дорзален хипокамп, *substantia nigra* (Mansour et al., 1988; Herkenham et al., 1991; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992; Rodriguez et al., 2001).

Други мозъчни области като PAG, *nucl. raphe*, *nucl. centromedialis thalami* притежават умерен брой канабиноидни и опиоидни свързващи участъци, но имат по-значителна роля в антиноцицепцията (Lichtman et al., 1996).

Както *in vivo*, така и *in vitro* експерименти доказват сходството в ефектите на двете групи вещества, което повдига логично въпроса за евентуалното им взаимодействие.

Показано е обръщане на канабиноид/опиоид индуцираната аналгезия от агонисти на канабиноидните или опиоидните рецептори (Welch, 1993; Reche et al., 1996a, b; Cichewicz et al., 1999). Съвместното въвеждане на агонисти на канабиноидните и опиоидните рецептори потенцира антиноцицептивния ефект в сравнение със самостоятелното им приложение при различни модели на остра болка (Cichewicz et al., 1999; Smith et al., 1998; Welch and Eads, 1999; Cichewicz and McCarthy, 2003). Синергизмът се наблюдава и при приложение на неефективни, субмаксимални, дози от веществата и се блокира от канабиноидни или опиоидни рецепторни антагонисти (Reche et al., 1996a; Smith et al., 1998; Cichewicz, 2004).

Окончателно функционалната връзка между двете групи вещества е доказана в опити с животни, при които генетично липсват канабиноидни или опиоидни рецептори. Физиологичното взаимодействие между опиоидната и канабиноидната системи е

необходимо за развитието на опиоидно медиирания отговор на стреса (Valverde et al., 2000a).

Една от **първите хипотези** с цел обясняване механизма на взаимодействието е свързана с възможността за конвергиране върху общи *G*-протеини. В *in vitro* опити с използвани различни *G*-протеини е изследвана степента на активирането им от отделните вещества в зависимост от експресията на двата вида рецептори (Shapira et al., 2000, 2003; Massi et al., 2003). В опити *in vivo* са изучени механизмите на толерантност и зависимост, както и тяхното повлияване (Vigano` et al., 2003; Gonzales et al., 2002, 2003; Corchero et al., 2004).

Оформя се и **втора хипотеза** за възможно взаимодействие между опиоидите и канабиноидите на пострецепторно ниво, чрез сходни вътреклетъчни сигнални механизми. Резултатите са донякъде противоречиви: от една страна е доказан опиоид-независим канабиноиден антиноцицептивен механизъм у продинорфин негативни мишки, а от друга, при същия вид животни негативните за μ- и δ- рецептори не се повлияват от ТХК (Gardell et al., 2002; Castane et al., 2003).

Независимо от напредъка в изясняването на някои аспекти от взаимодействието между опиоидната и ендоканабиноидната системи механизмите на тяхното взаимодействие не са напълно уточнени.

В достъпната ни литература не намерихме данни за взаимодействието между антиопиоидните пептиди от семейството на Tyr-MIF-1 и канабиноидната система. За антиопиоидните пептиди е известно, че се свързват както с някои от опиоидните рецептори, така и със свои собствени неопиоидни участъци

Стресът е водещ в патологията на нарушенията на ЦНС, ендокринната, сърдечно-съдовата, гастро-интестиналната, имунната и други системи. Доказано е участието както на опиоидната, така и на ендоканабиноидната системи в развитието на стрес-отговора на организма.

Разкриване на механизмите на взаимодействието между пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 и ЕКС в условия на стрес би могло да даде насоки за евентуално повлияване на някои неблагоприятни ефекти на стреса върху индивида.

ИЗВОДИ ОТ ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР

От направения литературен обзор произтичат следните изводи:

1. Ендоканабиноидната система повлиява както базалните нива на хипоталамо-хипофизо-надбъбречната ос, така и нейната фина регулация при стрес.

2. Анандамидът потенцира СИА при някои видове стрес.

3. Ендоканабиноидната и опиоидна системи си взаимодействат по време на стрес.

4. Ендогенните пептиди от семейството на Tyr-MIF-1 притежават опиоид-подобни и антиопиоидни ефекти.

5. В достъпната ни литература не намерихме данни за ефектите на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху канабиноидната система при имобилизационна и студова стрес-индуцирана аналгезия.

6. Няма данни за участието на опиоидергичната система в ефектите на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху канабиноидната система при имобилизационна и студова стрес-индуцирана аналгезия.

7. Няма данни и за ефектите на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху експресията и разпределението на CB1-реактивните неврони в *PAG* преди и след стрес.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА НАСТОЯЩАТА РАБОТА

Целта на настоящия труд бе:

1. Да се изследват ефектите на MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 върху ендоканабиноидната система при:

- *имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия;*
- *студова стрес-индуцирана аналгезия.*

2. Да се изследват ефектите на пептидите върху експресията на CB1-имунореактивни неврони в невропила на PAG:

- *при интактни животни;*
- *върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия;*
- *върху студова стрес-индуцирана аналгезия.*

За изпълнението на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се изследва базалната ноцицепция:

1.1. при контролни групи животни без излагане на стрес;

1.2. при контролни групи животни след излагане на едночасов имобилизационен стрес;

1.3. при контролни групи животни след излагане на едночасов студов стрес;

2. Да се изследва базалната ноцицепция при контролни групи животни след инжектиране с анандамид и AM251.

3. Да се изследва ефектът на анандамид и AM251 след едночасов стрес:

3.1. изследване ефекта на анандамид след едночасов имобилизационен стрес;

3.2. изследване ефекта на анандамид след едночасов студов стрес;

3.3. изследване ефекта на AM251 след едночасов имобилизационен стрес;

3.4. изследване ефекта на AM251 след едночасов студов стрес.

4. Да се изследват ефектите на анандамид и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1).

4.1. изследване ефектите на анандамид и пептидите от семейството на Tyr- MIF-1 върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия;

4.2. изследване ефектите на анандамид и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху студова стрес-индуцирана аналгезия.

5. Да се изследват ефектите на AM251 и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1).

5.1. изследване ефектите на AM251 и пептидите от семейството на Tyr- MIF-1 върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия;

5.2. изследване ефектите на AM251 и пептидите от семейството на Tyr- MIF-1 върху студова стрес-индуцирана аналгезия.

6. Да се изследват ефектите на анандамид и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1) върху третирани с налоксон животни:

6.1. изследване ефектите на анандамид и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 при третирани с налоксон животни върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия;

6.2. изследване ефектите на анандамид и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 при третирани с налоксон животни върху студова стрес-индуцирана аналгезия.

7. Да се изследват ефектите на AM251 и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1) върху третирани с налоксон животни:

7.1. изследване ефектите на AM251 и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 при третирани с налоксон животни върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия;

7.2. изследване ефектите на AM251 и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 при третирани с налоксон животни върху студова стрес-индуцирана аналгезия.

8. Имунохистохимично изследване на ефекта на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху експресията на CB1- имунореактивни неврони в невропила на PAG.

8.1. имунохистохимично изследване на експресията на CB1-имунореактивни неврони в невропила на PAG в норма и след стрес (имобилизационен и студов).

8.2. имунохистохимично изследване на ефекта на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху експресията на *CB1*-имунореактивни неврони в невропила на PAG след стрес (имобилизационен и студов).

Експериментите бяха проведени върху **246** мъжки бели плъхове линия Wistar (180-200 г). Животните бяха отглеждани в нормални условия при температура 22 ± 2°C, със свободен достъп на храна и вода. Светлината бе с регулиран цикъл: 12 часа светло/12 часа тъмно.

Всички опити бяха провеждани 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*

При този метод промените в болковата активност се измерват с аналгезиметър *Ugo Basile*. Върху задната лапа на плъх, поставена под "острието" на аналгезиметъра, се прилага постепенно увеличаващ се натиск (до 500 г – с оглед предотвратяване увреждане на животното). Степента на аналгезията се отчита по специфична двигателна реакция на плъха, 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).

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

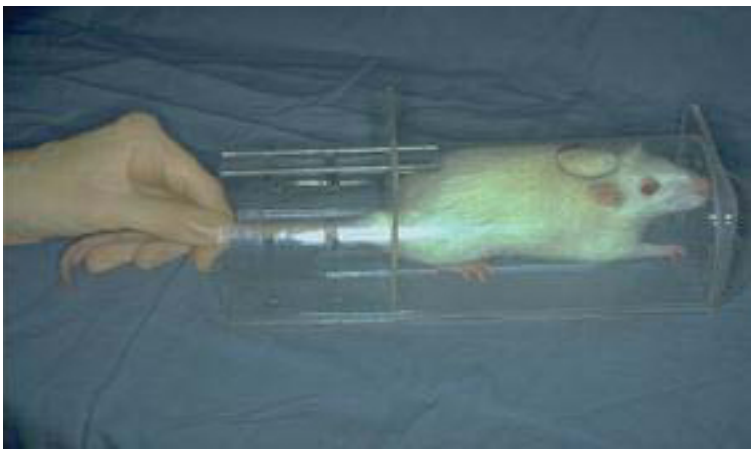
1.2. Метод с прилагане на термично дразнене – *Hot-plate (HP) test*

При този метод върху лапите на свободно подвижни животни се прилага термичен болков стимул (55°C ± 1°C). Ноцицептивният праг се верифицира 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. Времето се отчита в секунди. Максимално времетраене на изследването е 30 сек., с оглед предотвратяване увреждане на животните (снимка 2).

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

2. Модели на стрес

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



Снимка 3. *Модел на имобилизационен стрес.*

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

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛИ:

Животните бяха разпределени в групи по 6. Всички вещества бяха въвеждани интраперитонеално (*i.p.*). Агонистът на CB1-рецепторите анандамид бе разтворен в *DMSO* и въвеждан в доза от 1 мг/кг; антагонистът AM251, разтворен в *DMSO*, бе въвеждан в доза 1,25 мг/кг. В зависимост от опитната постановка агонистът и антагонистът на канабиноидните рецептори бяха въвеждани: 1) в интактни животни; 2) веднага след прекратяване на стрес-процедурата; 3) след стрес и 20 мин след *Naloxone hydrochloride dehydrate* (1 мг/кг).

Пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1, Tyr-K-MIF-1) бяха разтворени във физиологичен разтвор. В зависимост от опитната постановка пептидите бяха въвеждани в доза 1мг/кг: 1) 10 мин след анандамид или AM251; **2)** 20 мин след налоксон и 10 мин след анандамид или AM251. Контролната група бе инжектирана с физиологичен разтвор 1 мл/кг и *DMSO* 1мл/кг. Ноцицептивните измервания започваха 10 мин след съответния стрес.

II. In vitro методи

За хистохимично оцветяване: След анестезия с тиопентал (40 мг/кг, *i.p.*) експерименталните животни по три от всяка група бяха перфузирани транскардиално с 4% разтвор на параформалдехид в 0.1 *M* 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 *M* фосфатен буфер, *pH* 7.4, материалът се поставяше в буфер и оставяше да пренощува при температура 4°С.

Приготвяха се серийни срези на замразяващ микротом (*Reihart-Jung*), като всеки седми срез с дебелина 40 μм се използваше при изследването.

За имунохистохимичното изследване бяха използвани белязани антитела за *CB1*-невронални елементи.

ИМУНОЦИТОХИМИЧНИ ПРОЦЕДУРИ:

1. Серийните коронарни срезове през 40 *n*м посредством замразяващ микротом (Reichert-Jung) бяха поставяни в разтвор на моноклоналното антитяло - анти-*CB1* (Santa Crus).

2. Вторични антитела и маркиращи субстанции и нормални серуми:

1. Биотинилиран анти-миши *IgG*, получен от кон (Santa Cruz).
2. 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

Количествените данни за плътност на невроните бяха получени с помощта на компютърен образен анализатор *Olympus-CUE2*.

Статистическа обработка

Експерименталните данни са обработени с *ANOVA* и се сравняваха с помощта на *Student`s t*-тест, 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*.

I. Базална ноцицепция при контролни животни и след имобилизационен и студов стрес

1.1. Изследване на базалната ноцицепция при контролни животни.

В контролна група от 6 животни, инжектирани с физиологичен разтвор в обем 1 мл/кг, *i.p.*, бяха измерени болковият праг (PP-тест) и HP-латентността (HP-тест) (Фиг. 1-16).

1.2. Изследване на базалната ноцицепция при животни след едночасов имобилизационен стрес.

След едночасова имобилизация болковият праг бе статистически достоверно ($p<0.001$) по-висок в сравнение с интактните животни за целия период на изследването (Фиг. 1, 3, 9, 11).

HP-латентността бе удължена статистически достоверно ($p<0.001$) на 10-та мин от изследването, а на 20-та и 30-та бе намалена статистически достоверно ($p<0.001$) спрямо контролните стойности (Фиг. 2, 4, 10, 12).

Известно е, че острият стрес индуцира аналгезия. Получените от нас резултати са в подкрепа на литературните данни, че едночасовият имобилизационен стрес повишава болковия праг и HP- латентността спрямо тези при интактните животни.

1.3. Изследване на базалната ноцицепция при животни след излагане на едночасов студов стрес.

Студовият стрес предизвика статистически достоверно ($p<0.001$) по-висок болков праг в сравнение с интактните животни за целия период на изследването (Фиг. 5, 7, 13, 15). HP-латентността бе статистически достоверно удължена ($p<0.001$) на 10-та и 20-та мин. от изследването, докато на 30-та мин. се наблюдаваше тенденция към намаляване спрямо контролните стойности (Фиг. 6, 8, 14, 16). Получените от нас резултати са в подкрепа на литературните данни.

При студов и топлинен стрес се увеличава антиноцицепцията при *tail-flick* и *hot-plate* тестовете (Galina and Kastin, 1987; Kavaliers, 1987). Получените резултати са в

унисон с литературните данни т.е. едночасовият студов стрес повиши болковия праг и HP-латентността спрямо интактни животни.

II. Изучаване ефектите на анандамид и AM251 върху базалната ноцицепция при контролни животни и след имобилизационен и студов стрес

2.1. Изследване на базалната ноцицепция при интактни животни след инжектиране с анандамид или *AM*251:

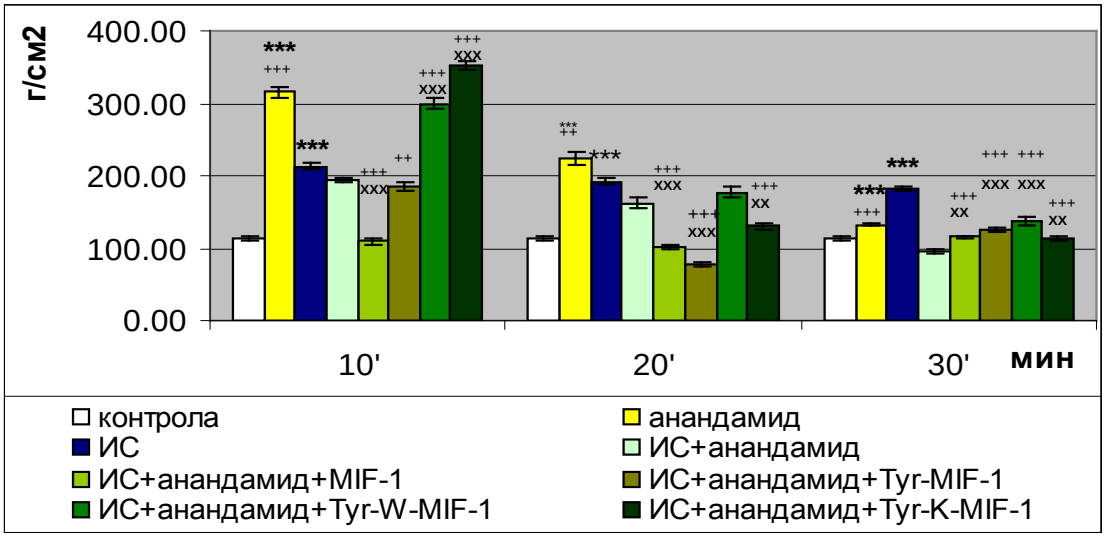
2.1.1. Изследване на базалната ноцицепция при интактни животни след инжектиране с анандамид.

Системното въвеждане на канабиноиди в различни области на ЦНС предизвиква аналгезия (Walker and Hohmann, 2005). Доказано е участието на PAG (Lichtman et al., 1995), таламуса (Martin et al., 1996), ростралната вентромедиална медула (Martin et al., 1998; Meng et al., 1998) и амигдалата (Marsicano et al., 2002; Martin et al., 1999) в антиноцицептивното действие на ендоканабиноидите.

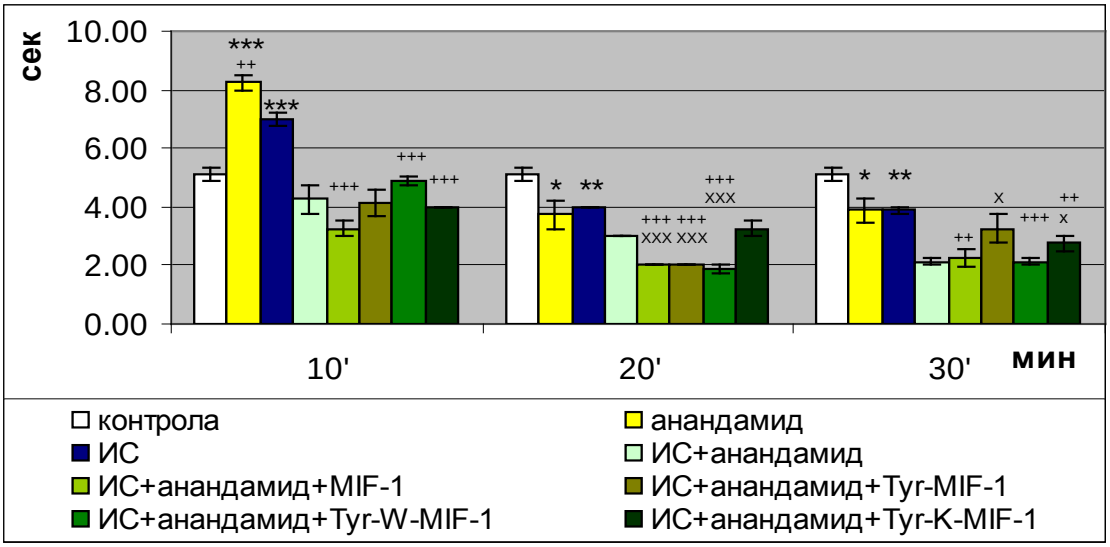
Животните, инжектирани с анандамид, показаха статистически достоверно по-висок болков праг ($p<0.001$) в сравнение с контролите за целия период на изследването (Фиг. 1,5,9,13).

HP-латентността при животните, инжектирани с анандамид, бе статистически достоверно удължена ($p<0.001$) спрямо контролите (Фиг. 2,6,10,14).

Получените от нас резултати съвпадат с литературните данни, а именно, че анандамидът в доза 1мг/кг повиши болковия праг при PP-теста и HP-латентността при интактни животни.



Фиг. 1. *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг, i.p.) и анандамид (доза 1 мг/кг, i.p.) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия при PP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.*** p>0.001 спрямо контролата; +++ p>0.001, ++ p>0.01 спрямо ИС; xxx p>0.001, xx p>0.01 спрямо ИС+анандамид.*



Фиг. 2. *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг, i.p.) и анандамид (доза 1 мг/кг, i.p.) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия при HP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001, ** p>0.01, * p>0.05 спрямо контролата; +++ p>0.001, ++ p>0.01 спрямо ИС; xxx p>0.001, xx p>0.01, x p>0.05 спрямо ИС+анандамид.*

2.1.2. Изследване на базалната ноцицепция при интактни животни след инжектиране с AM251.

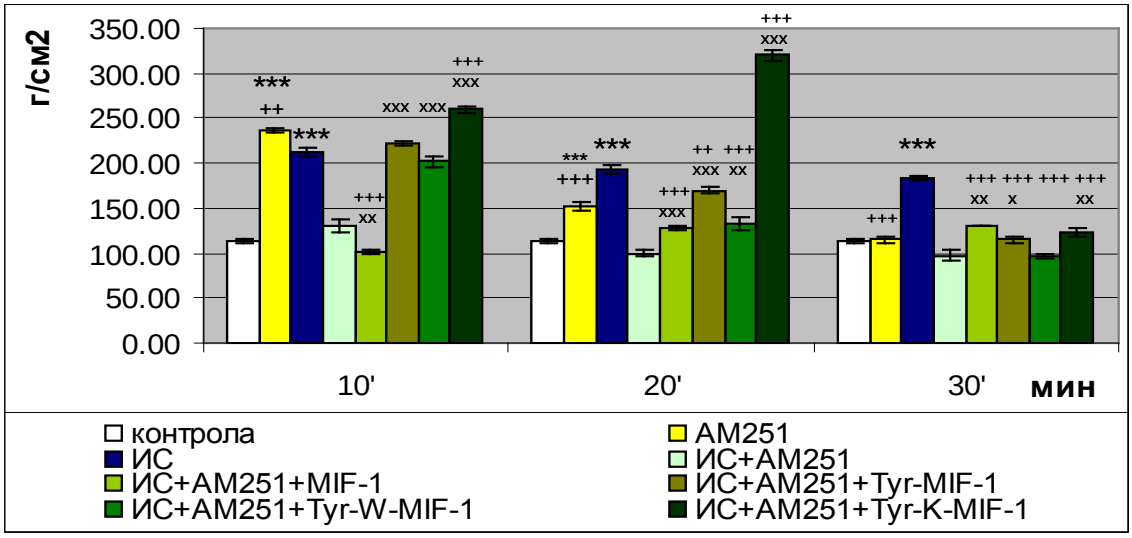
Аналгезията от действието на ендоканабиноидите се антагонизира от *N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyra-zole-3-carboxa-mide* или *AM*251, както и от други съединения, например синтетичния *SR141716A* (Katsuyama et al., 2010; Rinaldi-Carmona, 1994).

На контролна група от 6 животни инжектирани с AM251 (в доза 1,25 мл/кг, *i.p.*) бяха определени болковият праг и HP-латентността (Фиг. 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16).

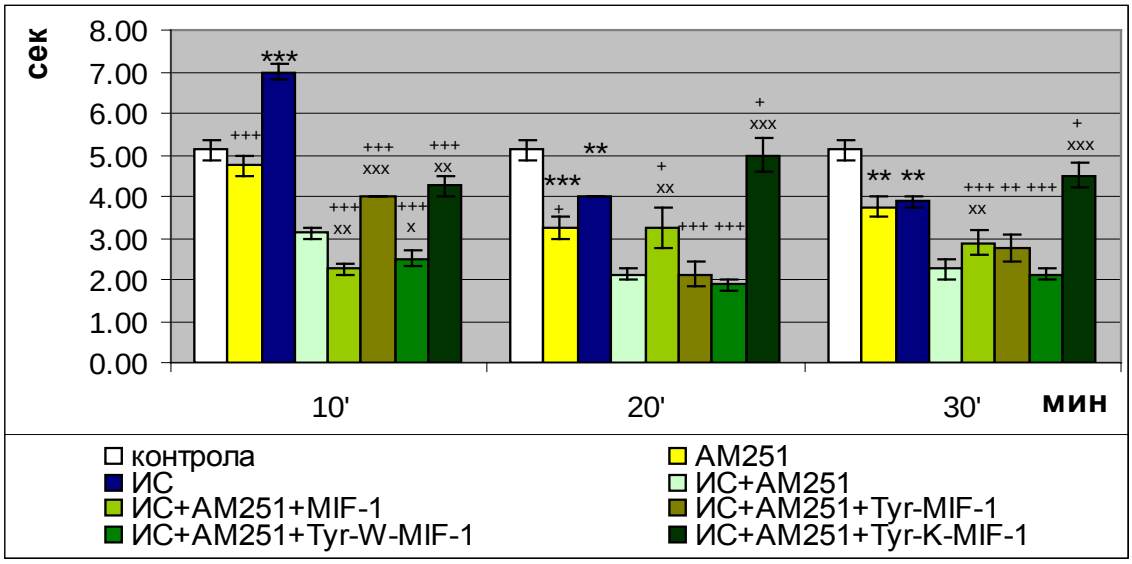
Животните, инжектирани с AM251, показаха статистически достоверно по-висок болков праг (p<0.001) в сравнение с контролите на 10-та и 20-та мин. от изследването (Фиг. 3, 7, 11, 15).

HP-латентността при животните с AM251 на 10-та мин. показа тенденция към намаляване, а на 20-та и 30-та мин. бе статистически достоверно (p<0.001) скъсена спрямо контролите (Фиг. 4, 8, 12, 16).

Получените резултати показаха, че AM251 повишава болковия праг, но скъсява HP-латентността спрямо интактните животни.



Фиг. 3. *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг i.p.) и AM251 (доза 1,25 мг/кг, i.p.) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия при PP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001 спрямо контролата; +++ p>0.001, ++ p>0.01 спрямо ИС; xxx p>0.001, xx p>0.01 спрямо ИС+AM251.*



Фиг. 4. *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг i.p.) и AM251 (доза 1,25 мг/кг, i.p.) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия при HP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001, ** p>0.01 спрямо контролата; +++ p>0.001, + p>0.05 спрямо ИС; xxx p>0.001, xx p>0.01, x p>0.05 спрямо ИС+АМ251.*

2.2. Изследване ефекта на анандамид върху едночасова имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия.

При PP-теста анандамидът понижи статистически достоверно болковия праг на 20-та (p<0.01) и 30-та (p<0.001) мин. в сравнение със стойностите при имобилизационен стрес (Фиг. 1, 9).

HP-латентността бе статистически достоверно (p<0.001) скъсена спрямо контролните стойности на животните без и след едночасов имобилизационен стрес за целия период на изследването (Фиг. 2, 10).

Получените резултати показват, че анандамидът понижава болковия праг и скъсява HP-латентността след имобилизационен стрес.

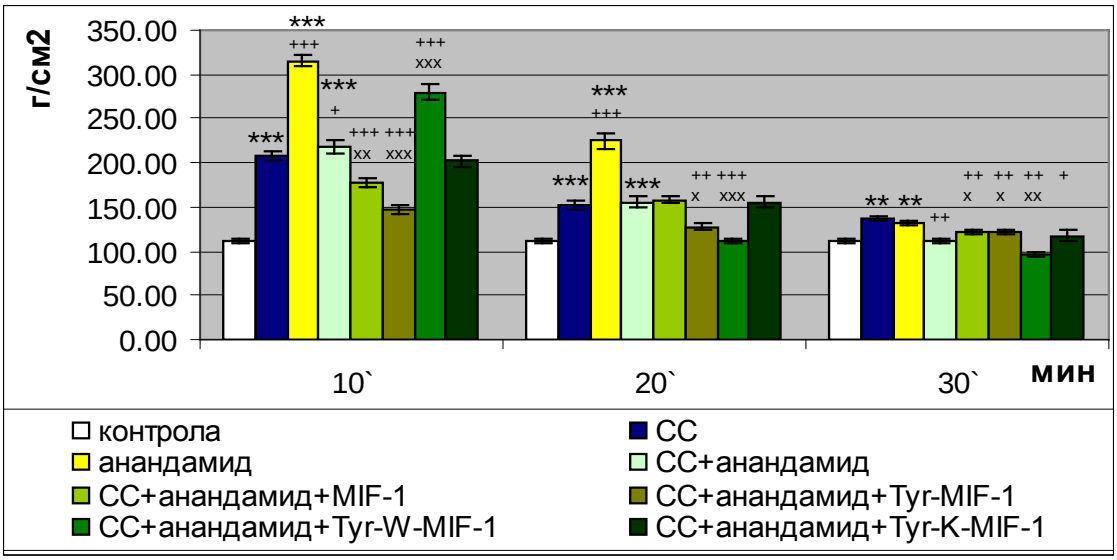
2.3. Изследване ефекта на анандамид върху едночасова студова стрес-индуцирана аналгезия.

При PP-теста анандамидът повиши статистически достоверно (p<0.001) болковия праг на 10-та и 20-та мин. спрямо животните след CC (Фиг. 5, 13).

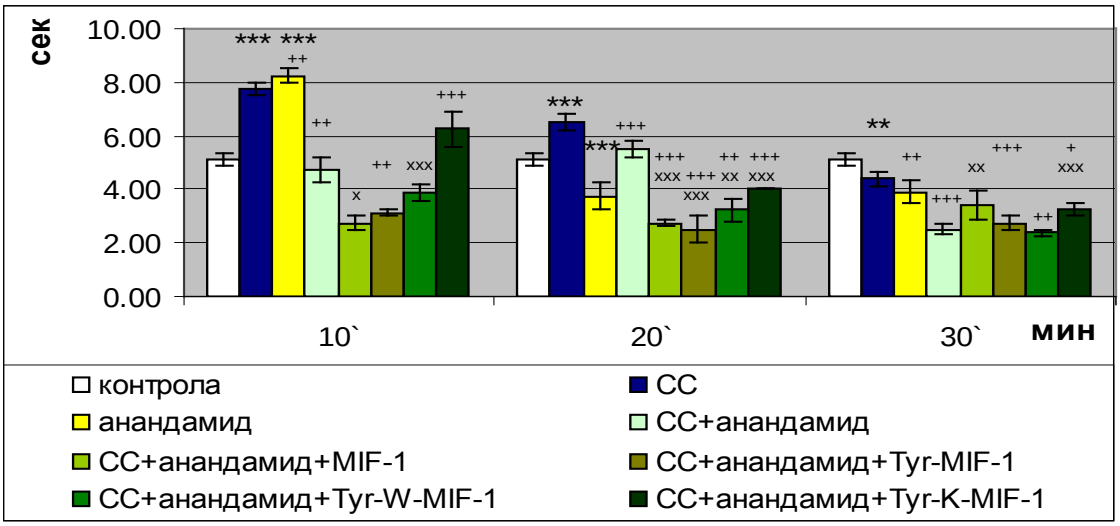
Термичният тест показа съизмерими HP-латентности при животните с анандамид след студов стрес и контролните стойности на 10-та и 20-та мин. На 30-та мин. HP-латентността при животните с анандамид след едночасов студов стрес бе статистически

достоверно скъсена (p<0.001) както в сравнение с контролните животни, така и при тези след едночасов студов стрес (Фиг. 6, 14).

От получените резултати се вижда, че анандамидът повишава болковия праг, но скъсява НР-латентността след студовия стрес.



Фиг. 5. *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг i.p.) и анандамид (доза 1 мг/кг, i.p.) върху студова стрес-индуцирана аналгезия при РР тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001, ** p>0.01 спрямо контролата; +++ p>0.001, ++ p>0.01, + p>0.05 спрямо СС; xxx p>0.001, xx p>0.01 спрямо СС+анандамид.*



Фиг. 6. *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг i.p.) и анандамид (доза 1 мг/кг, i.p.) върху студова стрес-индуцирана аналгезия при НР тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001, ** p>0.01 спрямо контролата; +++ p>0.001, ++ p>0.01, + p>0.05 спрямо СС; xxx p>0.001, xx p>0.01, x p>0.05 спрямо СС+анандамид.*

2.4. Изследване ефекта на AM251 върху едночасова имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия.

При PP-теста се наблюдаваше статистически достоверно ($p<0.001$) по-нисък болков праг за целия период на изследването в сравнение с този при имобилизационния стрес, като болковият праг бе равен на този на контролните животни (Фиг. 3, 11).

При термичния тест HP-латентността бе статистически достоверно ($p<0.001$) скъсена спрямо контролните стойности при интактните животни и след едночасов имобилизационен стрес за целия период на изследването (Фиг. 4, 12).

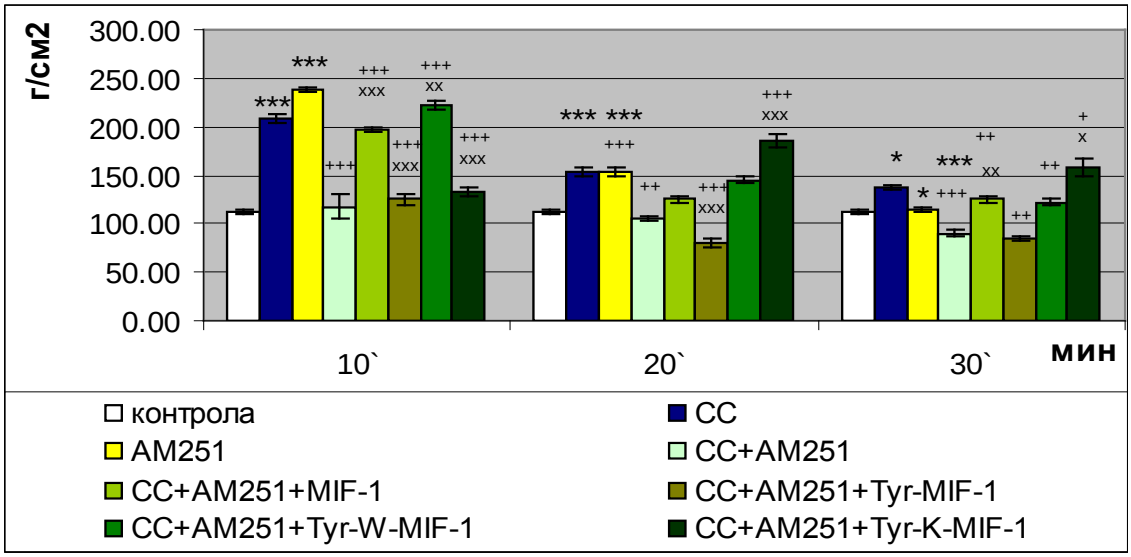
Получените от нас резултати показват, че AM251 понижава болковия праг и скъсява HP-латентността след имобилизационен стрес, което е в подкрепа на литературните данни.

2.5. Изследване ефекта на AM251 след едночасова студова стрес-индуцирана аналгезия.

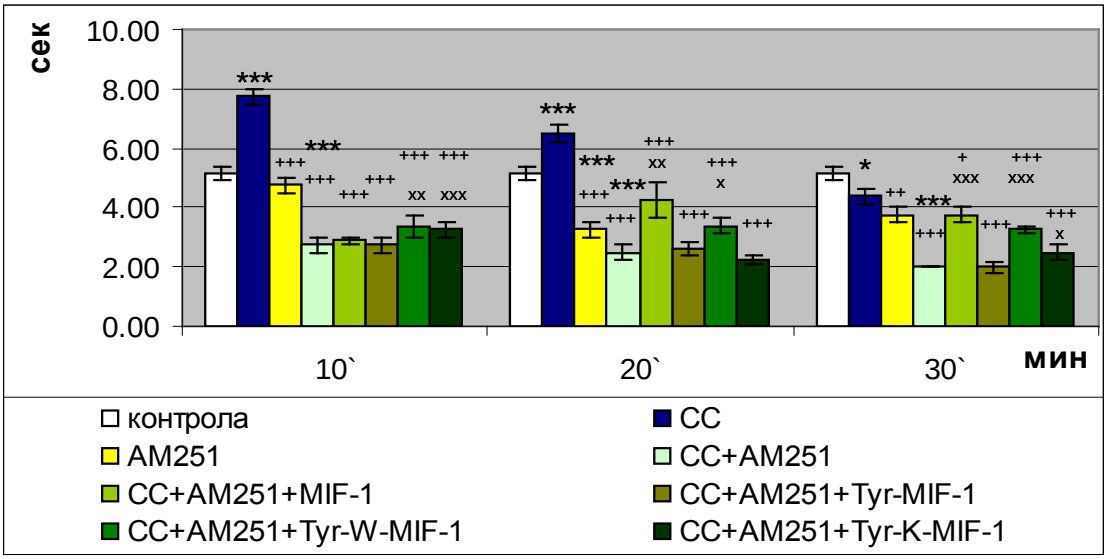
При PP-теста се наблюдаваше статистически достоверно ($p<0.001$) по-нисък болков праг за целия период на изследването в сравнение с този на студовия стрес, като прагът бе съизмерим с този на контролите (Фиг. 7, 15).

При термичния тест HP-латентността бе статистически достоверно ($p<0.001$) скъсена спрямо контролните стойности на животните без и след едночасов студов стрес за целия период на изследването (Фиг. 8, 16).

Получените резултати са в подкрепа на литературните данни, а именно, че AM251 при PP-теста има ефект на антагонист на CB1-рецепторите, а при HP-теста е предимно обратен агонист.



Фиг. 7. *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг i.p.) и AM251 (доза 1,25 мг/кг, i.p.) върху студова стрес-индуцирана аналгезия при PP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001 спрямо контролата; +++ p>0.001, ++ p>0.01, + p>0.05 спрямо CC; xxx p>0.001, xx p>0.01, x p>0.05 спрямо CC+AM251.*



Фиг. 8. *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг i.p.) и AM251 (доза 1,25 мг/кг, i.p.) върху студова стрес-индуцирана аналгезия при HP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001 спрямо контролата; +++ p>0.001, + p>0.05 спрямо CC; xxx p>0.001, xx p>0.01, x p>0.05 спрямо CC+AM251.*

III. Изучаване ефектите на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 - MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 върху канабиноидната система след имобилизационен и студов стрес

Както опиоидните пептиди, така и ендоканабиноидите притежават доказан аналгетичен ефект, който е по-силно изразен при опиоидите.

Синергичният ефект при съвместно въвеждане на двете групи вещества би могъл да се изрази в потенциране на аналгезията спрямо въвеждането им поотделно (Cichewicz and McCarthy, 2003; Cichewicz and Welch, 2003; Tham et al., 2005; Roberts et al., 2006; Smith et al., 2007; Wilson et al., 2008).

3.1. Изследване ефектите на анандамид и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия.

PP-тестът показа, че въведен след ИС+анандамид, MIF-1 доведе до болков праг, равен на този на контролните стойности и статистически достоверно ($p<0.001$) по-нисък от този при ИС за целия период на изследването, както и от ИС+анандамид на 10-та и 20-та мин. Въведен след ИС+анандамид, Tyr-MIF-1 доведе до съизмерим болков праг на 10-та мин. с този след ИС и ИС+анандамид. Ноцицептивните прагове след въвеждане на Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 след ИС+анандамид бяха статистически достоверно ($p<0.001$) по-високи в сравнение с контролата, ИС и ИС+анандамид (Фиг. 1). На 20-та мин. от изследването измерените болкови прагове при въвеждането на Tyr-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 след ИС+анандамид бяха статистически достоверно ($p<0.001$) по-ниски от тези след ИС и ИС+анандамид. Болковият праг за Tyr-W-MIF-1 след ИС+анандамид бе съизмерим с този на ИС и по-висок от този на ИС+анандамид (Фиг. 1). На 30-та мин. болковите прагове след всичките пептиди след ИС+анандамид бяха статистически достоверно ($p<0.001$) по-ниски от тези след ИС, но по-високи от тези за ИС+анандамид (Фиг.1).

При термичния тест и за четирите пептида се наблюдаваше статистически достоверно ($p<0.001$) скъсяване на HP-латентността на 10-та мин. от изследването в сравнение с тази при ИС (Фиг. 2). Пептидите MIF-1, Tyr-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведини след ИС+анандамид, показаха скъсявяане на HP-латентността спрямо ИС+анандамид, а при Tyr-W-MIF-1 се наблюдаваше удължаване на HP-латентността. HP-латентността след MIF-1, Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1 на 20-та мин. беше скъсена статистически достоверно ($p<0.001$) спрямо ИС и ИС+анандамид. HP-латентността след Tyr-K-MIF-1 след ИС+анандамид бе съизмерима с тази на ИС+анандамид, но скъсена спрямо ИС. На 30-та мин. HP-латентностите и за четирите пептида след ИС+анандамид бяха скъсени спрямо тази при ИС. Tyr-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 след ИС+анандамид удължиха HP-латентността спрямо тази при ИС+анандамид (Фиг. 2).

Получените резултати показаха, че изследваните пептиди, въведени съвместно с анандамид, понижиха болковия праг и НР-латентността в сравнение с тези на имобилизационния стрес.

MIF-1, въведен след ИС+анандамид, понижи болковия праг и НР-латентността в сравнение с имобилизационния стрес+анандамид. Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след ИС+анандамид, повишиха болковия праг в сравнение с този при имобилизационен стрес+анандамид.

3.2. Изследване ефектите на *AM*251 и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия.

При РР-теста се наблюдаваше статистически достоверно ($p<0.001$) увеличение на болковия праг на 10-та мин. от изследването за Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след ИС+AM251, в сравнение с този при ИС+AM251 (Фиг. 3). Болковият праг за MIF-1, въведен след ИС+AM251, бе понижен в сравнение с този при ИС+AM251. На 20-та мин. от изследването болковите прагове и за четирите пептида, въведени след ИС+AM251, бяха статистически достоверно ($p<0.001$) по-високи от този при ИС+AM251, като най-висок болков праг се наблюдаваше при Tyr-K-MIF-1. На 30-та мин. болковият прагът за MIF-1, въведен след ИС+AM251, бе статистически достоверно ($p<0.001$) по-висок спрямо ИС+AM251, докато при Tyr-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след ИС+AM251, се наблюдаваше тенденция към понижение. Болковият праг след Tyr-W-MIF-1, въведен след ИС+AM251, бе съизмерим с този след ИС+AM251 (Фиг. 3).

Термичният тест показа на 10-мин. от изследването статистически достоверно скъсяване на НР-латентността след MIF-1 ($p<0.01$) и Tyr-W-MIF-1 ($p<0.05$), въведени след ИС+AM251, в сравнение с ИС+AM251, докато Tyr-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след ИС+AM251, показаха статистически достоверно ($p<0.01$) удължаване на НР-латентността. Всички стойности бяха статистически достоверно ($p<0.001$) скъсени спрямо ИС (Фиг. 4). На 20-та мин. от изследването НР-латентността след Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1, въведени след ИС+AM251, бе съизмерима с ИС+AM251, но статистически достоверно ($p<0.001$) скъсена спрямо ИС.

MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след ИС+AM251, показаха статистически достоверно ($p<0.001$) удължена НР-латентност в сравнение с ИС+AM251, като стойността на НР-латентността след Tyr-K-MIF-1 бе статистически достоверно ($p<0.001$) удължена и спрямо ИС (Фиг. 4). На 30-та мин. от изследването НР-латентността след MIF-1 и Tyr-MIF-1, въведени след ИС+AM251, бе статистически достоверно ($p<0.01$)

удължена в сравнение с ИС+АМ251, но статистически достоверно ($p<0.01$) скъсена спрямо ИС. НР-латентността след Tyr-W-MIF-1, въведен след ИС+АМ251, бе съизмерима с тази след ИС+АМ251, но статистически достоверно ($p<0.001$) скъсена спрямо ИС. НР-латентността след Tyr-K-MIF-1, въведен след ИС+АМ251, бе статистически достоверно ($p<0.001$) удължена както спрямо ИС, така и спрямо ИС+АМ251(Фиг. 4).

Следователно, въведени съвместно с АМ251, пептидите MIF-1, Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1 понижиха болковия праг и НР-латентността в различна степен за изследвания период в сравнение с имобилизационния стрес.

Въведени съвместно с АМ251, четирите пептида удължиха болковия праг и НР-латентността в различна степен за изследвания период в сравнение с имобилизационен стрес+АМ251.

3.3. Изследване ефектите на анандамид и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху студова стрес-индуцирана аналгезия.

Механичният тест показа, че на 10-та мин. от изследването болковият праг на четирите пептида, въведени след СС+анандамид, бе статистически достоверно ($p<0.001$) по-висок от контролната стойност.

В сравнение с този на студовия стрес и СС+анандамид бе отчетена тенденция към понижение за MIF-1, въведен след СС+анандамид, и статистически достоверно ($p<0.01$) по-нисък болков праг за Tyr-MIF-1, въведен след СС+анандамид. За Tyr-W-MIF-1, въведен след СС+анандамид, се наблюдаваше статистически достоверно ($p<0.001$) по-висок болков праг. Стойността на болковия праг след Tyr-K-MIF-1, въведен след СС+ анандамид, бе съизмерима с тази след студовия стрес (Фиг. 5).

На 20-та мин. от изследването болковият праг на MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след СС+анандамид, бе съизмерим с този след СС и СС+анандамид, но статистически достоверно ($p<0.01$) по-висок от контролите без стрес. Ноцицептивните прагове на Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1, въведени след СС+анандамид, бяха статистически достоверно ($p<0.01$) по-ниски от СС и СС+анандамид (Фиг. 5).

На 30-та мин. болковите прагове на MIF-1, Tyr-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след СС+анандамид, бяха съизмерими с тези след СС и СС+анандамид. Болковият праг за Tyr-W-MIF-1, въведен след СС+анандамид, бе съизмерим с контролната стойност и статистически достоверно ($p<0.01$) по-нисък от този след СС и СС+анандамид (Фиг. 5).

Термичният тест показа, че на 10-та мин. от изследването HP-латентността след MIF-1, Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1, въведени след CC+анандамид, бе статистически достоверно ($p<0.001$) скъсена спрямо контролите без стрес, след CC и след CC+анандамид. Tyr-K-MIF-1, въведен след CC+анандамид, показа на 10-та мин. скъсена HP-латентност в сравнение със CC, но удължена спрямо контролите без стрес и след CC+анандамид.

На 20-та и 30-та мин. HP-латентостта и за четирите пептида, въведени след CC+анандамид, бе статистически достоверно ($p<0.001$) скъсена спрямо контролите без стрес и след CC. По отношение на животните след CC+анандамид MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след CC+анандамид, показаха тенденция към понижена HP-латентост на 30-та мин. (Фиг. 6).

Следователно, въведени съвместно с анандамид, MIF-1, Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1 понижиха болковия праг и HP-латентността в различна степен за изследвания период от време в сравнение със студовия стрес и студов стрес+анандамид.

3.4. Изследване ефектите на AM251 и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху студова стрес-индуцирана аналгезия.

Болковият праг на MIF-1, въведен след CC+AM251, бе съизмерим с този на студовия стрес на 10-та мин., а на Tyr-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след CC+AM251, бяха по-ниски. Болковият праг за Tyr-W-MIF-1, въведен след CC+AM251, показа тенденция към повишение в сравнение със този на CC. През останалия период на изследването праговете на MIF-1, Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1, въведени след CC+AM251, бяха по-ниски в сравнение с този на CC.

Болковият праг на Tyr-K-MIF-1, въведен след CC+AM251, остана по-висок в сравнение с този на CC (Фиг. 7). Болковият праг за Tyr-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след CC+AM251, на 10-та мин. от изследването остана съизмерим с този след CC+AM251, докато за MIF-1 и Tyr-W-MIF-1, въведени след CC+AM251, се наблюдаваше статистически достоверно ($p<0.001$) по-висок болков праг в сравнение с този на CC+AM251. През останалия период от изследването болковият праг на MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след CC+AM251, бе статистически достоверно ($p<0.001$) по-висок от този след CC+AM251. Болковият праг след Tyr-MIF-1, въведен след CC+AM251, бе по-нисък от този след CC+AM251(Фиг. 7).

При термичния тест се наблюдаваше статистически достоверно ($p<0.001$) скъсяване на НР-латентността за четирите пептида, въведени след СС+АМ251, в сравнение с тази на СС за целия период на изследването (Фиг. 8).

По отношение на СС+АМ251 бяха наблюдавани съизмерими НР-латентности за всички пептиди на 10-та мин., като за Tyr-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след СС+АМ251, се запазиха до края на изследването. MIF-1 и Tyr-W-MIF-1, въведени след СС+АМ251, показаха на 20-та и 30-та мин. от изследването статистически достоверно ($p<0.001$) удължаване на НР-латентността в сравнение със тава на СС+АМ25 (Фиг. 8).

Получените резултати показаха, че MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени съвместно с АМ251, повишиха болковия праг и удължиха НР-латентността в различна степен за изследвания период в сравнение със студовия стрес+АМ251. Tyr-K-MIF-1, въведен съвместно с АМ251, повиши болковия праг, но скъси НР-латентността в сравнение със студовия стрес.

IV. Изучаване ефектите на анандамид и АМ251 и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 - MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, при третирани с налоксон животни върху стрес-индуцираната аналгезия.

С цел изучаване участието на опиоидергичната система при стрес-индуцираната аналгезия с участието на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 и анандамид или АМ251 бе въвеждан неселективният антагонист на опиоидните рецептори налоксон.

4.1. Изследване ефектите на анандамид и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 при третирани с налоксон животни върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия.

Механичният тест показа, че третирането с налоксон и въвеждането на анандамид не промени статистически достоверно болковия праг на 10-та и 20-та мин. от изследването, докато на 30-та мин. се наблюдаваше статистически достоверно ($p<0.001$) по-висок болков праг в сравнение с този след ИС+анандамид (Фиг.9).

Третирането с налоксон с последващо въвеждане на анандамид+пептидите след стрес показа промяна на болковия праг спрямо този на съответния стрес+ анандамид+пептид без налоксон.

Болковият праг с налоксон и MIF-1 след стрес+анандамид на 10-та и 20-та мин., както и този с налоксон и Tyr-MIF-1 след стрес+анандамид на 20-та мин. от изследването бе статистически достоверно по-висок ($p<0.001$) спрямо боковия праг при стрес+анандамид+пептид без налоксон.

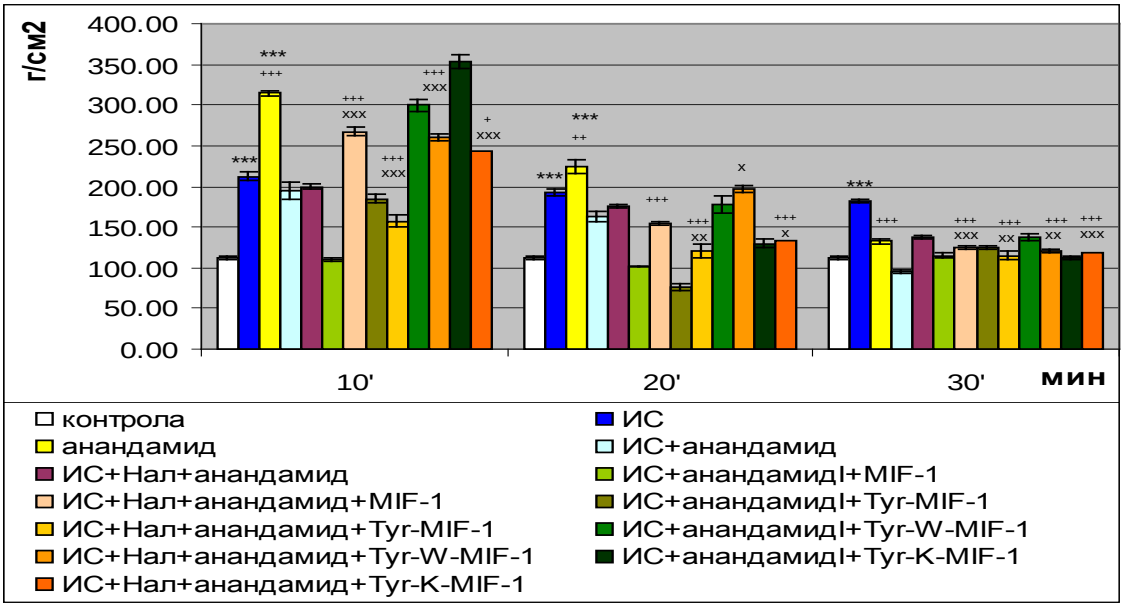
На 10-та мин. от изследването Tyr-W-MIF-1 след стрес+анандамид и Tyr-K-MIF-1 след стрес+анандамид показаха след налоксон статистически достоверно ($p<0.001$) по-нисък болков праг в сравнение с този на животните след ИС без налоксон (Фиг.9). На 20-та мин. от изследването болковият праг на Tyr-W-MIF-1 след стрес+анандамид и Tyr-K-MIF-1 след стрес+анандамид бяха съизмерими с този на пептида без налоксон. За Tyr-W-MIF-1 след стрес+анандамид болковият прагът бе съизмерим, а за Tyr-K-MIF-1 след стрес+анандамид - статистически достоверно ($p<0.001$) по-нисък от този след ИС. На 30-та мин. болковият праг на всички изследвани пептиди след стрес+анандамид бе съизмерим с този при нетретираните с налоксон животни (Фиг. 9).

При термичния тест третирането на животните с налоксон+анандамид не промени статистически достоверно НР-латентността в сравнение с животните без налоксон за целия период на изследването (Фиг.10).

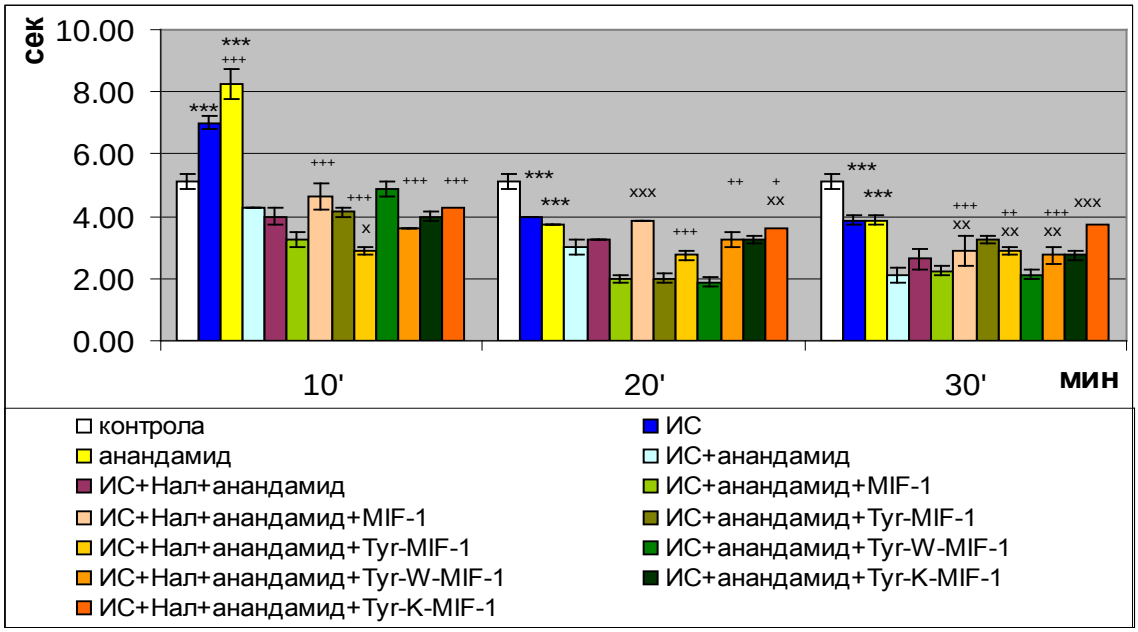
НР-латентността бе скъсена за целия период на изследване след ИС+налоксон+анандамид в сравнение с тази след ИС.

НР-латентността след ИС+налоксон+анандамид+пептид показа скъсяване спрямо тази при ИС за целия период на изследването. НР-латентността бе скъсена при животните с налоксон след въвеждането на пептидите, а също така след ИС+налоксон+анандамид+пептид за Tyr-MIF-1 на 10-та и 30-та мин., а за Tyr-W-MIF-1 на 10-та мин. (Фиг.10).

Следователно, въвеждането на налоксон преди всеки един от пептидите+ анандамид след имобилизационен стрес понижи болковия праг и скъси НР-латентността за Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1.



Фиг. 9. *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг i.p.) и анандамид (доза 1 мг/кг, i.p.) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия при претретирани с налоксон (доза 1 мг/кг) животни при PP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001 спрямо контролата; +++ p>0.001, ++ p>0.01, + p>0.05 спрямо ИС; xxx p>0.001, xx p>0.01, x p>0.05 спрямо ИС+AM251.*



Фиг. 10. *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг, i.p.) и анандамид (доза 1 мг/кг, i.p.) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия при претретирани с налоксон (доза 1 мг/кг) животни при HP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001 спрямо контролата; +++ p>0.001, ++ p>0.01, + p>0.05 спрямо ИС; xxx p>0.001, xx p>0.01, x p>0.05 спрямо ИС+анандамид.*

4.2. Изследване ефектите на анандамид и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 при третирани с налоксон животни върху студова стрес-индуцирана аналгезия.

Механичният тест показа, че третирането с налоксон и последващо въвеждане на анандамид след едночасов СС статистически достоверно ($p<0.001$) понижи болковия праг през целия период на изследването в сравнение с този след СС, СС+анандамид и анандамид без стрес, като отчетените стойности бяха съизмерими с контролните (Фиг. 11).

Третирането с налоксон с последващо инжектиране на анандамид и пептид след едночасов СС показа стойности на болковите прагове, съизмерими с тези при СС в групите с MIF-1 след СС+анандамид, Tyr-MIF-1 след СС+анандамид и Tyr-K-MIF-1 след СС+анандамид, докато групата с Tyr-W-MIF-1 след СС+анандамид показа статистически достоверно ($p<0.001$) по-висок болков праг на 10-та мин. от изследването (Фиг. 11).

Болковият праг бе повишен след СС+анандамид+MIF-1 и СС+анандамид+Tyr-MIF-1 при третиране с налоксон. Болковият праг остана съизмерим с този без налоксон при СС+налоксон+анандамид+Tyr-W-MIF-1 и СС+налоксон+анандамид+Tyr-K-MIF-1 (Фиг. 11).

На 20-та мин. от изследването болковите прагове след СС+ налоксон+анандамид+пептид показаха тенденция към понижаване спрямо тези след СС в групите с MIF-1 и Tyr-MIF-1. При животните с Tyr-W-MIF-1 болковият прагът след стрес с налоксон и въвеждане на анандамид и пептид бе съизмерим с този без пептид и статистически достоверно по-нисък ($p<0.01$) от този след СС. При животните с Tyr-K-MIF-1 се наблюдаваше тенденция към повишение на болковия праг спрямо този след СС и статистически достоверно ($p<0.01$) по-висок болков праг спрямо СС+налоксон+анандамид без пептид (Фиг. 11).

На 30-та мин. от изследването болковите прагове във всички групи след едночасов СС+налоксон+анандамид+пептид бяха статистически достоверно ($p<0.05$) по-високи от този след едночасов СС+налоксон+анандамид без пептид (Фиг. 11).

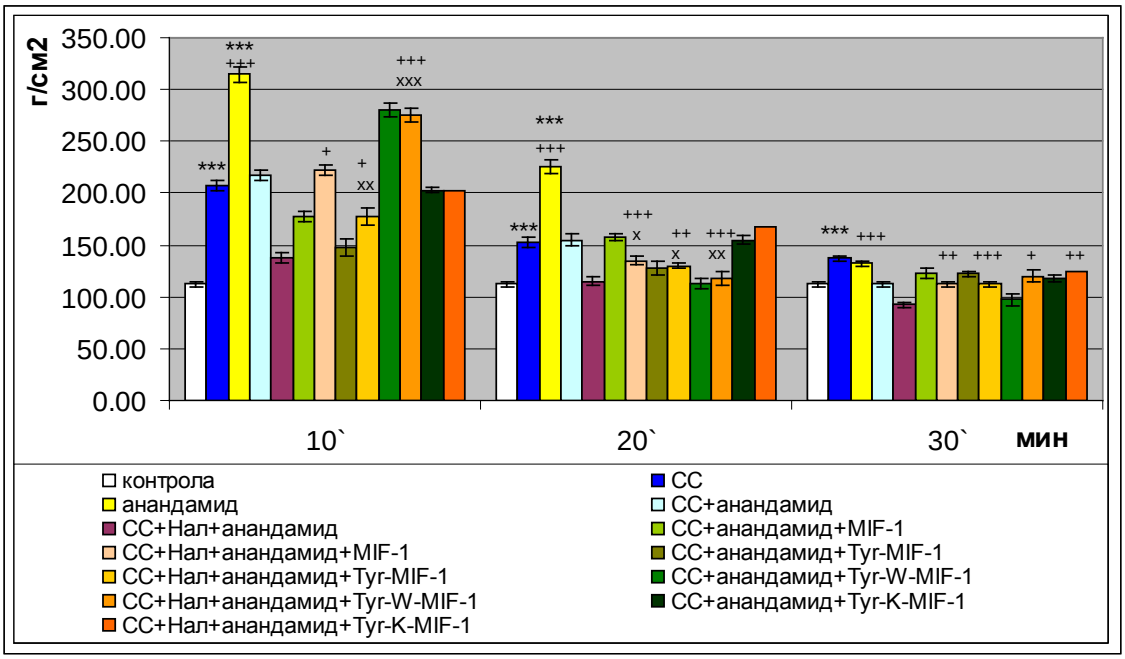
При термичния тест за целия изследван период се наблюдаваше статистически достоверно ($p<0.01$) скъсяване на HP-латентността при животните с налоксон в сравнение със тази на СС. При едночасов СС+налоксон+анандамид без пептид на 10-та мин. бе отчетено статистически достоверно ($p<0.01$) скъсяване в групите с Tyr-MIF-1+СС+анандамид и Tyr-W-MIF-1+СС+анандамид, докато при MIF-1+СС+анандамид и

Tyr-K-MIF-1+CC+анандамид HP-латентностите бяха съизмерими с тези след CC+налоксон+анандамид без пептид (Фиг. 12).

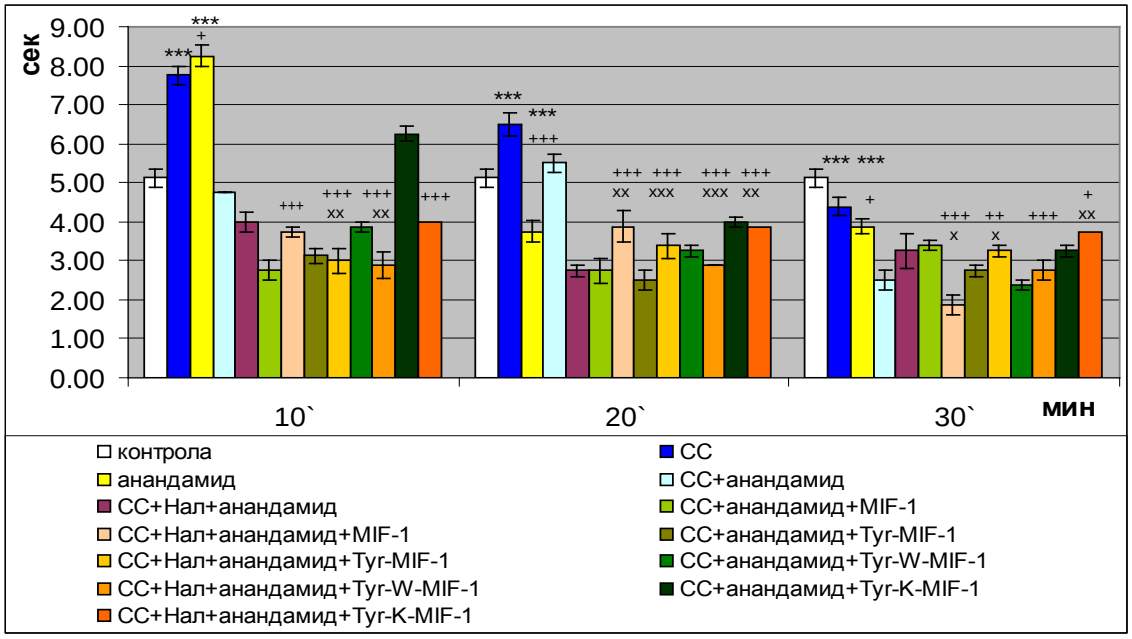
На 10-та и 20-та мин. при MIF-1 след CC+анандамид се наблюдаваше удължаване на HP-латентността и скъсяването й при Tyr-W-MIF-1 след CC+анандамид и Tyr-K-MIF-1 след CC+анандамид. При Tyr-MIF-1 след CC+анандамид не се наблюдаваше промяна на HP-латентността (Фиг. 12).

На 30-та мин. животните с MIF-1 след CC+анандамид показаха статистически достоверно ($p<0.5$) скъсена HP-латентност спрямо тези без пептид, докато останалите три пептида след CC+анандамид показаха HP-латентности, съизмерими с тази на групата без пептид (Фиг. 12).

Получените резултати показаха, че въвеждането на налоксон преди анандамид след студов стрес оказва по-слаб ефект върху студовата СИА в сравнение с имобилизационната.



Фиг. 11 *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг, i.p.) и анандамид (доза 1 мг/кг, i.p.) върху студова стрес-индуцирана аналгезия при третирани с налоксон (доза 1 мг/кг) животни при PP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** $p>0.001$ спрямо контролата; +++ $p>0.001$, ++ $p>0.01$, + $p>0.05$ спрямо CC; xx $p>0.01$, x $p>0.05$ спрямо CC+анандамид.*



Фиг. 12 *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг, i.p.) и анандамид (доза 1 мг/кг, i.p.) върху студова стрес-индуцирана аналгезия при третирани с налоксон (доза 1 мг/кг) животни при HP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001 спрямо контролата; +++ p>0.001, ++ p>0.01, + p>0.05 спрямо СС; xxx p>0.001, xx p>0.01, x p>0.05 спрямо СС+анандамид.*

4.3. Изследване ефектите на AM251 и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 при третирани с налоксон животни върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия.

Механичният тест показа, че третирането с налоксон на животни след едночасова имобилизация и въвеждане на AM251 без пептид не води до статистически достоверна промяна на болковия праг в сравнение с групата без налоксон, подложена на имобилизация+AM251. Болковите прагове за целия период на изследването бяха съизмерими с контролните, но статистически достоверно ($p<0.001$) по-ниски от болковия праг след ИС (Фиг. 13).

Въвеждането на пептид у третирани с налоксон животни след ИС+AM251 показа статистически достоверно ($p<0.001$) понижаване на болковия праг в сравнение с ИС, отчетено и за четирите изследвани пептида (Фиг. 13).

На 10-та мин. от изследването болковите праговете и за четирите пептида след имобилизация+налоксон+AM251 бяха съизмерими с този след имобилизация+налоксон+AM251 (Фиг. 13).

Болковите прагове при MIF-1 след имобилизация+налоксон+AM251, Tyr-W-MIF1 след имобилизация+налоксон+AM251 и Tyr-K-MIF-1 след имобилизация+

налоксон+AM251 показаха аналогични стойности до края на изследвания период, докато при Tyr-MIF-1 след имобилизация+налоксон+AM251 на 20-та и 30-та мин. бяха отчетени статистически достоверни ($p<0.01$) по-ниски болкови прагове. В сравнение с животните след ИС+AM251+пептид при въвеждането на налоксон бяха измерени по-ниски болкови прагове за целия период на изследването (Фиг. 13).

При термичния тест се наблюдаваше статистически достоверно ($p<0.001$) скъсяване на HP-латентността и за четирите пептида, въведени у третирани с налоксон животни след едночасов ИС+AM251 спрямо стойностите за ИС на 10-та мин. На 20-та мин. се наблюдаваше статистически достоверно удължаване ($p<0.01$) на HP-латентността при MIF-1 след имобилизация+налоксон+AM251 и Tyr-K-MIF-1 след имобилизация+налоксон+AM251. HP-латентността при Tyr-W-MIF-1 след имобилизация+налоксон+AM251 бе съизмерима с тази след ИС. Тенденцията се запази и на 30-та мин. от изследването (Фиг. 14).

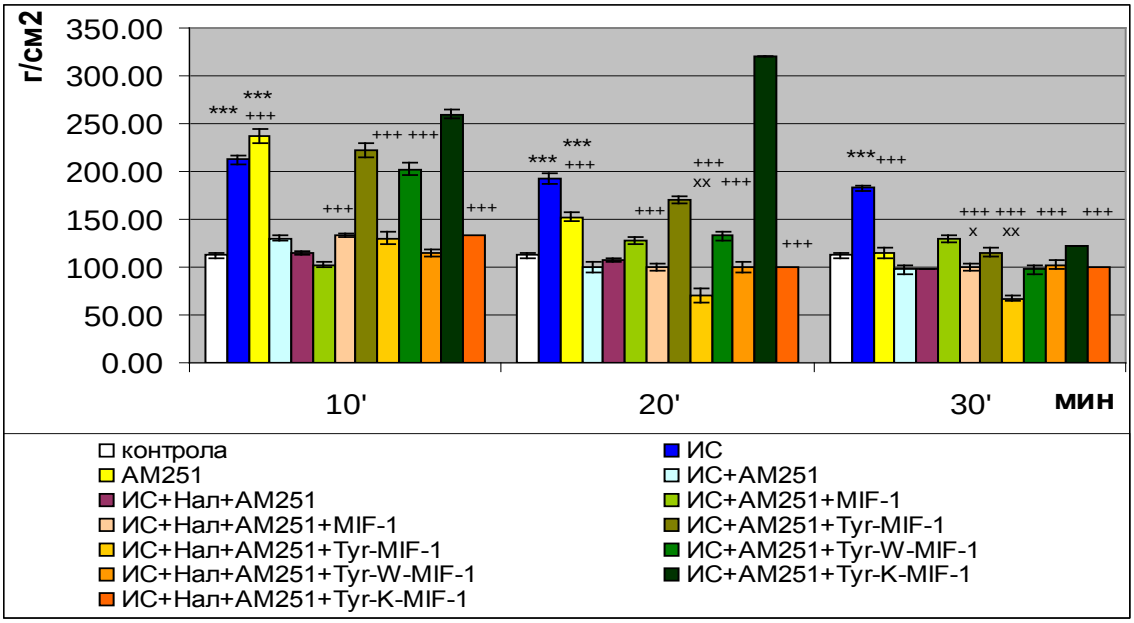
Tyr-MIF-1 след имобилизация+налоксон+AM251 показа през целия изследван период статистически достоверно ($p<0.001$) скъсяване на HP-латентността спрямо животните след ИС (Фиг. 14).

Третирането с налоксон на животни след едночасов ИС+AM251 без пептид показа през целия период на изследването аналогични резултати както при PP-теста.

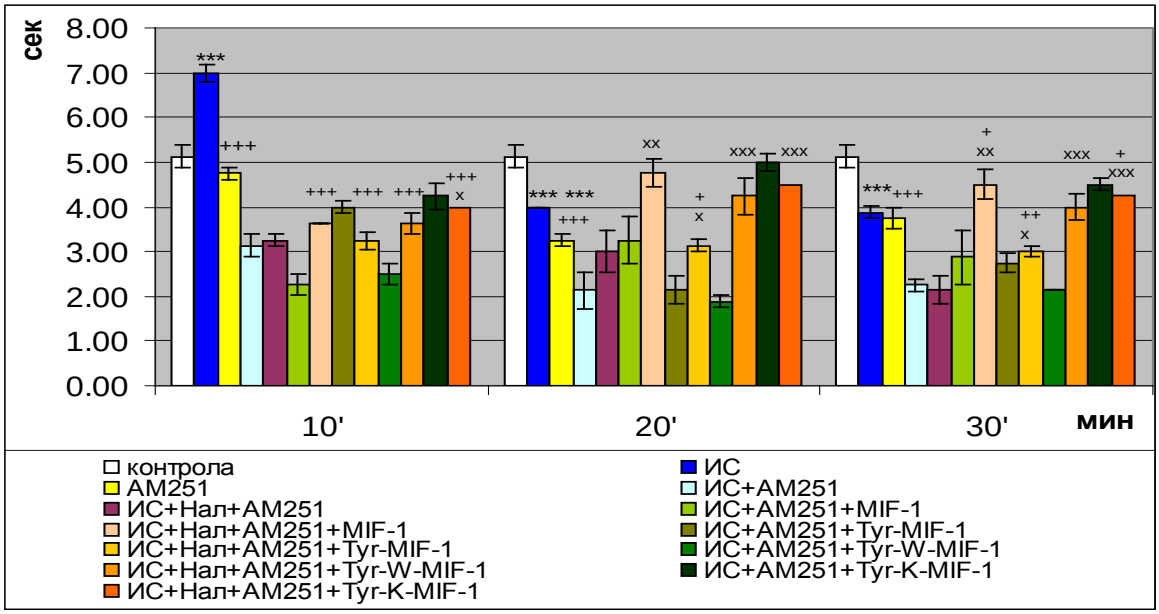
HP-латентността при MIF-1 след имобилизация+налоксон+AM251, Tyr-W-MIF-1 след имобилизация+налоксон+AM251 и Tyr-K-MIF-1+имобилизация +налоксон+AM251 на 20-та и 30-та мин., а при Tyr-MIF-1 след имобилизация+ налоксон+AM251 на 30-та мин. бе статистически достоверно удължена спрямо животните без пептид ± налоксон (Фиг. 14).

В сравнение с животните без налоксон, въвеждането му показа удължаване на HP-латентността при MIF-1 след имобилизация+налоксон+AM251 и Tyr-W-MIF-1 след имобилизация+налоксон+AM251 за целия период на изследването и скъсяване на HP-латентността за Tyr-K-MIF-1 след имобилизация+налоксон+AM251 през целия период за Tyr-MIF-1 след имобилизация+налоксон+AM251 на 10-та и 20-та мин. от изследването (Фиг. 14).

Следователно, налоксонът понижава болковия праг и скъсява HP-латентността при съвместното въвеждане на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 и AM251 след имобилизационен стрес.



Фиг. 13 *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг i.p.) и AM251 (доза 1,25 мг/кг, i.p.) върху имобилиьационна стрес-индуцирана аналгезия при PP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001 спрямо контролата; +++ p>0.001 спрямо ИС; xx p>0.01, x p>0.05 спрямо ИС+АМ251.*



Фиг. 14 *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг, i.p.) и AM251 (доза 1,25 мг/кг, i.p.) върху имобилиьационна стрес-индуцирана аналгезия при HP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001 спрямо контролата; +++ p>0.001, ++ p>0.01, + p>0.05 спрямо ИС; xxx p>0.001, xx p>0.01, x p>0.05 спрямо ИС+АМ251.*

4.4. Изследване ефектите на AM251 и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 при третирани с налоксон животни върху студова стрес-индуцирана аналгезия.

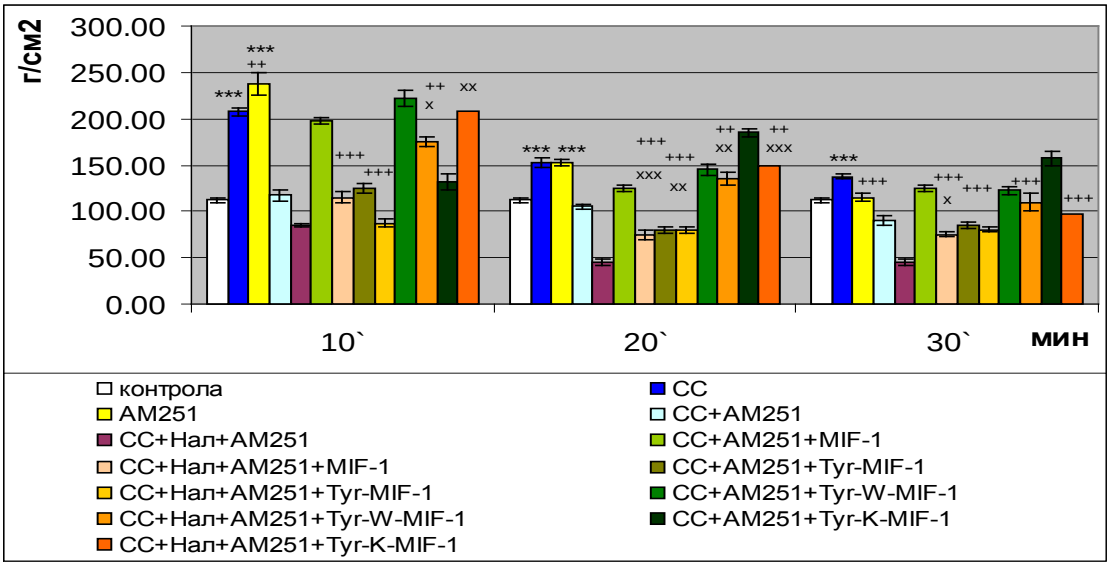
Механичният тест показа, че третирането с налоксон на животни след едночасов студов стрес+AM251 понижи статистически достоверно ($p<0.001$) болковия праг в сравнение с контролите, на животните след едночасов СС ($p<0.001$) и животните след едночасов СС+AM251 ($p<0.001$) за целия период на измерването (Фиг. 15).

В сравнение с животните, третирани с налоксон след едночасов СС без пептид, въвеждането на пептид у третирани с налоксон животни след едночасов СС+AM251 статистически достоверно ($p<0.001$) повиши болковия праг след MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 за целия период на изследването, както и след Tyr-MIF-1 на 20-та и 30-та мин. (Фиг. 16). Най-високи стойности на болковия праг бяха отчетени след Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 на 10-та мин. от изследването, като праговете бяха съизмерими с този след едночасов СС (Фиг. 15).

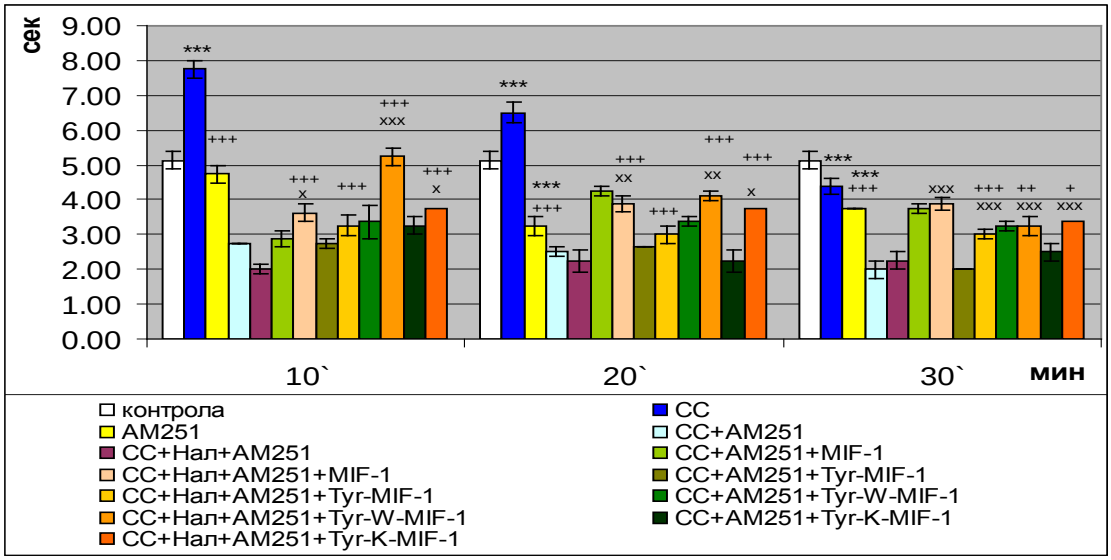
В сравнение с животните без налоксон въвеждането му понижи болковия праг при MIF-1 след СС+AM251 и Tyr-W-MIF-1 след СС+AM251 за целия период на изследването. При Tyr-K-MIF-1 след СС+AM251 на 20-та и 30-та мин. от изследването се наблюдаваше понижение на болковия праг (Фиг. 15).

При термичния тест се наблюдаваха сходни резултати както при PP-теста (Фиг. 16).

Следователно, налоксонът понижи болковия праг и скъси HP-латентността при съвместно въвеждане на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 след СС+AM251, като ефектът бе по-късен и по-слабо изразен в сравнение с този след стреса, предизвикан от имобилизация.



Фиг. 15 *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг i.p.) и AM251 (доза 1,25 мг/кг, i.p.) върху студова стрес-индуцирана аналгезия при претретирани с налоксон (доза 1 мг/кг) животни при PP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001 спрямо контролата; +++ p>0.001, ++ p>0.01, + p>0.05 спрямо CC; xx p>0.01, x p>0.05 спрямо CC+анандамид.*



Фиг. 16. *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг, i.p.) и AM251 (доза 1,25 мг/кг, i.p.) върху студова стрес-индуцирана аналгезия при претретирани с налоксон (доза 1 мг/кг) животни при HP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001 спрямо контролата; +++ p>0.001, ++ p>0.01, + p>0.05 спрямо CC; xxx p>0.001, xx p>0.01, x p>0.05 спрямо CC+AM251.*

V. Имунохистохимично изследване на ефекта на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху експресията на CB1-имунореактивни неврони в невропила на PAG

5.1. Имунохистохимично изследване на експресията на CB1-имунореактивни неврони в невропила на PAG в норма и след стрес.

Известно е, че стресът води до функционални и структурни промени в организма в резултат от сложното взаимодействие между ендокринната, имунната и централната нервна системи.

Едночасовата имобилизация, както и студовият стрес повишават кортикотропин-освобождаващ фактор в *nucl. paraventricularis* на хипоталамуса (Costa et al., 1993; Karanth et al., 1993; Hori et al., 2004), т.е. повлиява регулацията на ХХН ос (Uribe et al., 1999; Gotti et al., 2005).

Литературните данни от последните години показаха, че канабиноидната система е широко застъпена в мозъчните области, свързани с отговора към стрес.

Известно е, че ендоканабиноидната система е широко разпространена невромодулаторна/невротрансмитерна система, играеща съществена роля в регулацията на синаптичната трансмисия. CB1 рецепторите са широко разпространени в мозъка (Herkenham et al., 1991; Tsou et al., 1998 a, b; Moldrich and Wenger, 2000) и имат по-ниски нива на експресия в периферните тъкани (кръвоносни съдове, имунни клетки и репродуктивни тъкани) (Parolaro, 1999; Hillard, 2000; Gorzalka and Hill, 2006).

CB1-рецепторът е експресиран от субпопулации глутамат-, ГАМК-, ацетилхолин, серотонин- и норадренергични неврони (Nakazi et al., 2000; Ohno-Shosaku et al., 2001; Schlicker and Kathmann, 2001), което показва, че канабиноидите притежават способността да потискат освобождаването на много невротрансмитери/ невромодулатори.

Области със значителна плътност на CB1-рецепторите са хипокампът, префронталният кортекс, амигдалата, хипоталамусът и моноаминергичните ядра на средния мозък, като *locus coeruleus* и *raphe dorsalis* (Herkenham et al., 1991; Tsou et al., 1998a, b).

Счита се, че канабиноидната система регулира невроналната активност чрез анатомични кръгове, въвлечени в отговора към стреса и чрез способността й да модулира невротрансмитерното освобождаване (Gorzalka et al., 2008).

В *in vivo* експерименти бе показано преходно покачване на съдържанието на два CB1-рецепторни агонисти – анандамид и 2-арахидоноилглицерол в PAG след *foot shock* стрес (Hohmann et al., 2005). По всяка вероятност след стресогенен стимул следва бързо активиране на ендоканабиноидното освобождаване (Hillard and Jarrahian, 2005). Съществуват данни, че инжектирането на CB1-рецепторен антагонист в нестресирани животни води до дозо-зависимо активиране на XXH ос (Manzaneres et al., 1999; Patel et al., 2004; Wade et al., 2006).

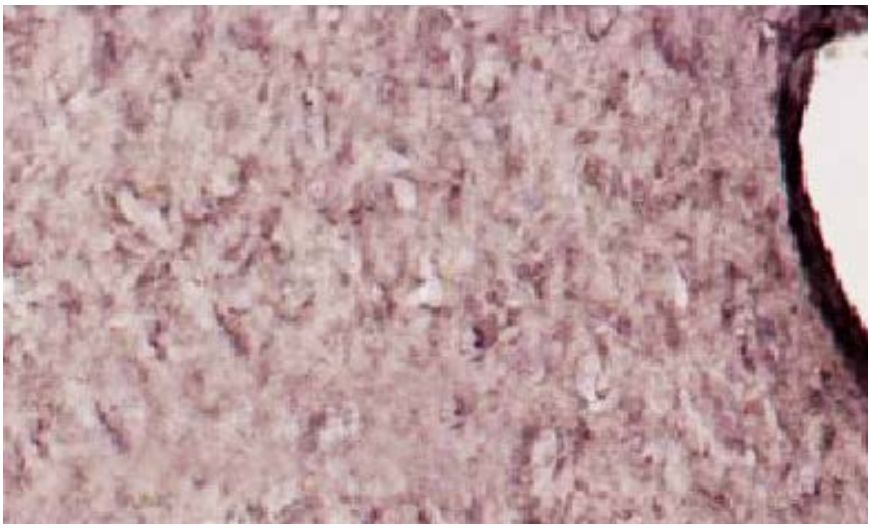
Тези данни показват, че CB1-рецепторите имат ключова роля в регулацията на XXH ос в норма и в условията на остър стрес.

Стимулирането на опиоидните рецептори в PAG активира низходящите пътища, потискащи ноцицепцията (Moreira et al., 2009). Имунохистохимични данни показват, че CB1-рецепторите са представени с умерена плътност в тази област (Herkenham et al., 1991; Tsou et al., 1998a). Въвеждането на CB1-рецепторни агонисти повишава *fos*-експресията и мозъчната метаболитна активност в PAG на плъхове, което предполага участието на тази структура в ефектите на системно въведени канабиноиди (Moreira et al., 2009). Освен това, субкутанното инжектиране на формалин (болков стимул), значително повишава освобождаването на анадамид в PAG (Walker et al., 1999; Hohmann and Suplita, 2006).

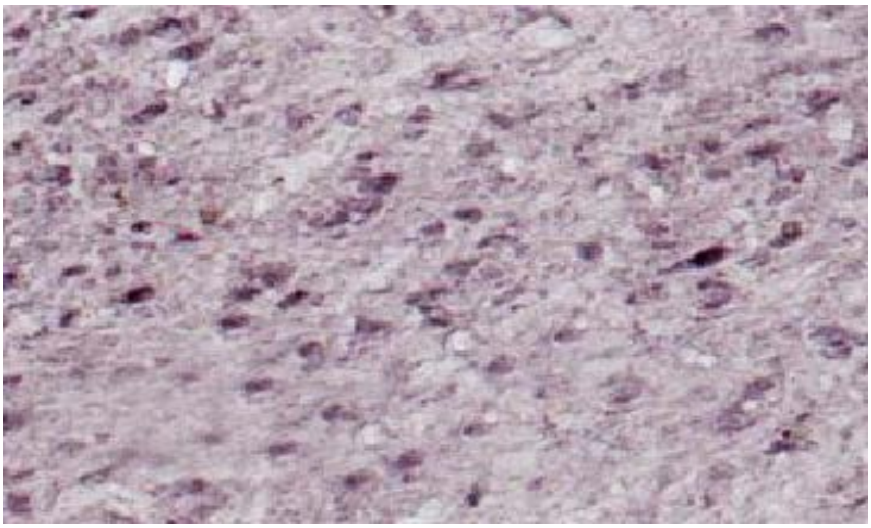
Известно е, че бързата индукция на канабиноидната невротрансмисия в PAG медиира неопиоидната стрес-индуцирана аналгезия (Hohmann et al., 2005). Съществуват доказателства, че опиоидите и канабиноидите модулират синаптичната трансмисия и продуцираната аналгезия в дорзолатералните, латералните и вентролатералните ядра на PAG (Paton, 1975; Zuardi, 2006).

Следователно, може да се предположи, че съществува взаимодействие между тези две системи, в частност поради синергизма между опиоиди и канабиноиди (Courtwright, 2001).

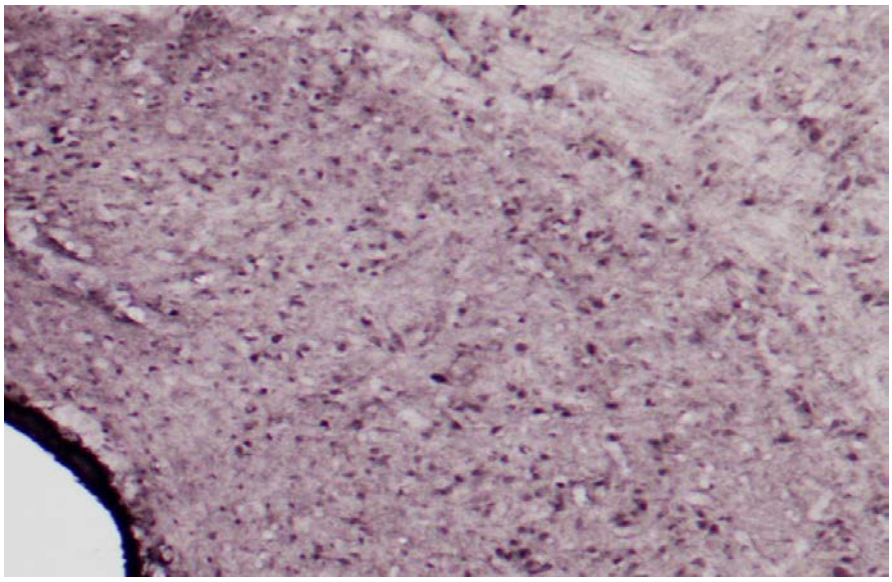
До този момент ***в достъпната ни литература не намерихме данни*** относно влиянието на имобилизационния и студовия стрес върху експресията на CB1-имунореактивните неврони в PAG.



Фиг. 17. *CB1-имунореактивни неврони в periaqueductal grey на интактни животни (x40).*



Фиг. 18. *CB1-имунореактивни неврони в periaqueductal grey на животни след едночасов имобилизационен стрес (x40).*



Фиг. 19. *CB1-имунореактивни неврони в periaqueductal grey на животни след едночасов студов стрес (x200).*

Нашите резултати показаха, че едночасовият имобилизационен и студов стрес повишават експресията на CB1-имунореактивните неврони в PAG в сравнение с контролите без стрес (Фиг. 17, 18 и 19).

5.2. Имунохистохимично изследване на ефекта на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху експресията на CB1-имунореактивни неврони в невропила на PAG след стрес.

Изучаването на механизмите на СИА са свързани с изясняване ролята на ендогенните опиоидни пептиди и техните рецептори. Доказано е, че опиоидната система медиира СИА (Akil et al., 1986; Amit and Galina, 1986). Тази компонента в СИА се означава като опиоидна. Съществува и неопиоидна компонента, в която участват редица системи (азотноокисна, адренергична и др.).

В последното десетилетие нарастна интересът към ендоканабиноидната система (Le Bars et al., 1980; Zhang et al., 1982; Bernatzky et al., 1983; Sivam and Ho, 1983; Garcia-Arraras et al., 1986; Nakamura et al., 1997; Smith et al., 1998).

Доказано е, че ендоканабиноидната система модулира реакциите на страх (Marsicano et al., 2002), болка (Fride and Mechoulam, 1996), СИА (Valverde et al., 2000; Finn et al., 2004; Hohmann et al., 2005; Vaughan, 2006).

При нарушения на канабиноидните рецептори не се наблюдава аналгезия след някои видове стрес (Valverde et al., 2000). Литературните данни от последните години показаха, че ЕКС е широко застъпена в мозъчните области, свързани с отговора към стреса.

Модулацията на мозъчната функция и синаптичната ефективност от страна на ендоканабиноидите се опосредства от процес, известен като ретроградно сигнализиране. При този вид сигнализиране невротрансмитерът или „сигнализиращият посредник” се освобождава от постсинаптичния неврон и упражнява своя ефект пресинаптично (Wilson and Nicoll, 2001).

Подобно ендоканабиноид-медиирано ретроградно сигналииране се реализира в областите на мозъка, където протича стрес-отговорът – хипокамп, амигдала, ноцицептивни участъци като PAG, рострална вентрална медула, спиналното ядро на *n. trigeminus*, части на гръбначния мозък (Lichtman et al., 1996; Meng et al., 1998; Jennings et al., 2001; Katona et al., 2001; Wilson and Nicoll, 2001).

Изясняването на функционалната роля на кратките пептиди е особено актуално, тъй като е известно, че те участват в регулацията на редица невронални процеси в мозъка.

Невропептидите от семейството на Tyr-MIF-1 се свързват както с опиоидни, така и със свои специфични неопиоидни места в мозъка (Erchegui et al., 1992; Hackler and Kastin, 1993).

Литературните данни показват, че пептидите се намират в области, отговорни за контрола на ноцицептивното предаване, емоциите, храненето, терморегулацията (Celis et al.,1971; Sakurada T. et al., 1983; Zadina and Kastin, 1986; Kavaliers, 1987; Horvath and Kastin, 1989, 1990; Krowicki, 1991; Erchegui et al., 1992; Erchegui, Zadina and Qui, 1993; Hackler, Kastin and Zadina, 1994; Kawabata et al., 1996; Bocheva and Lazarova , 2003).

Литературните данни, както и наши изследвания, показват, че пептидите инхибират някои форми на стрес-индуцирана аналгезия при имобилизационен, студов и топлинен стрес (Galina and Kastin 1985; Kavaliers and Hirst, 1986; Galina and Kastin, 1987, 1988; Bocheva and Dzambazova, 2008a,b). В ефектите на пептидите участват опиоидергичната, адренергичната и нитрикоксайдергична системи (Bocheva and Dzambazova, 2008a, b).

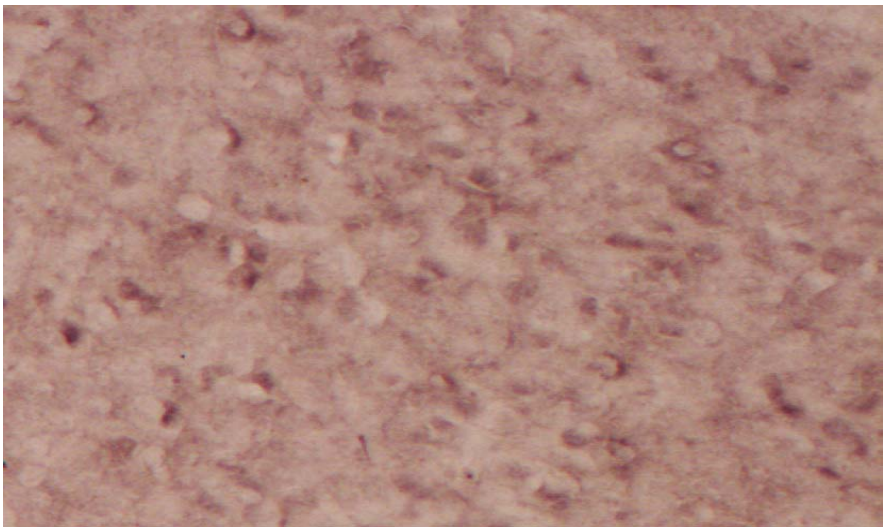
Въведени след имобилизационен, студов и топлинен стрес, пептидите понижават увеличената в резултат на трите вида стрес експресия на тирозинхидроксилазата и NOS-имунореактивни неврони в PAG (Bocheva and Dzambazova, 2008a,b) .

Както бе отбелязано, невропептидите от семейството на Tyr-MIF-1 взаимодействат с опиоидната, адренергичната, азотноокисната невротрансмитерни системи (Bocheva and Dzambazova, 2008a, b).

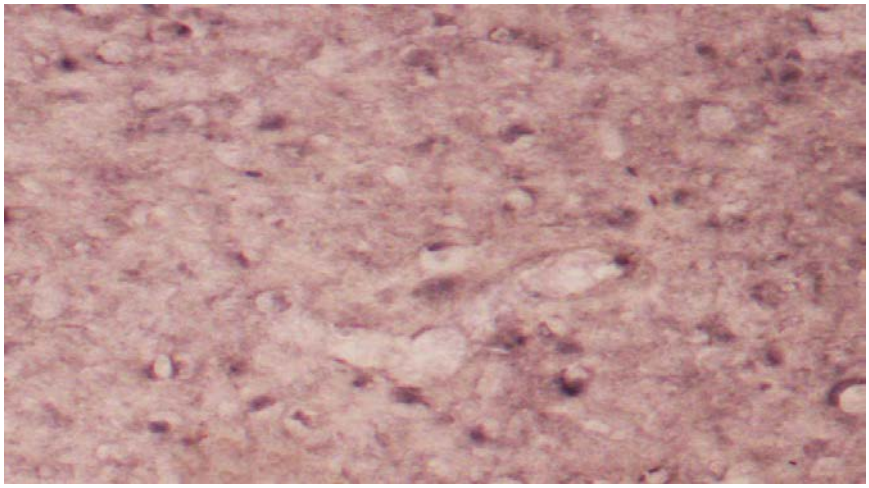
Бяха показани количествените разлики в експресията на CB1-рецепторите в условия на имобилизационен и студов стрес.

До този момент ***в достъпната ни литература не намерихме данни*** относно ефектите на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху експресията на CB1-рецепторите.

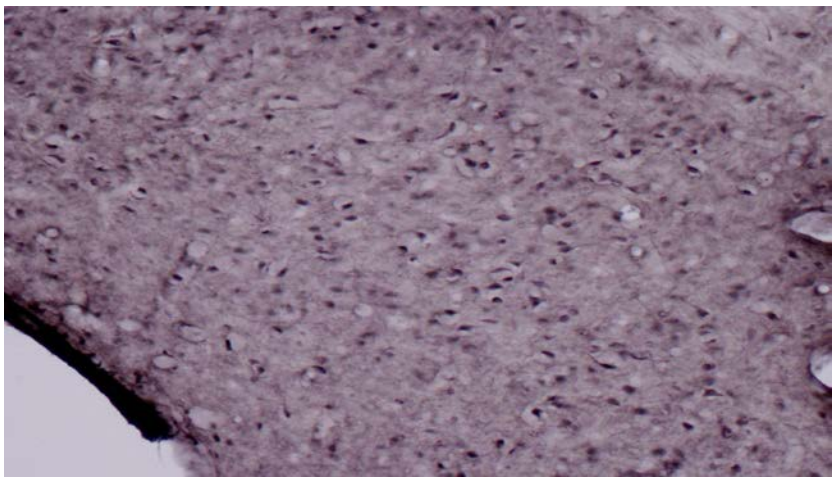
Ето защо ние изучихме експресията на CB1 в PAG след въвеждане на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1.



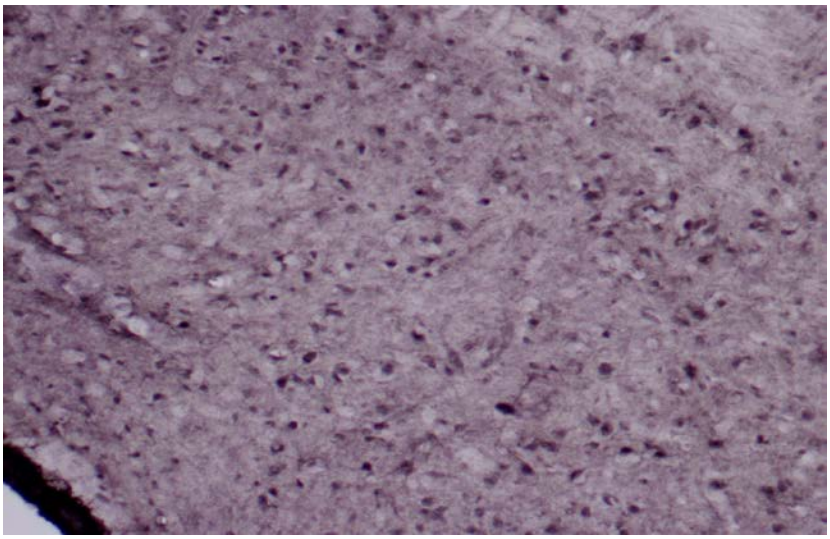
Фиг. 20. *Понижение на CB1-имунореактивните неврони в periaqueductal grey под влиянеие на MIF-1 след едночасов имобилизационен стрес (x40).*



Фиг. 21. *Понижение на CB1-имунореактивните неврони в periaqueductal grey под влиянеие на Tyr-MIF-1 след едночасов имобилизационен стрес (x40).*



Фиг. 22. *Понижение на CB1-имунореактивните неврони в periaqueductal grey под влияние на Tyr-W-MIF-1 след едночасов студов стрес (x200).*



Фиг. 23. *Понижение на CB1-имунореактивните неврони в periaqueductal grey под влияние на Tyr-K-MIF-1 след едночасов студов стрес (x200).*

Получените от нас резултати показаха, че изследваните пептидите понижиха експресията на CB1-имунореактивните неврони в PAG след едночасов имобилизационен и студов стрес (Фиг. 20-23).

ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Стресът най-често се дефинира като застрашаващо хомеостазата състояние или дисбаланс, на който организмът противодейства с комплекс от физиологични и поведенчески отговори, целящи възстановяване на изходното му равновесие (адаптивен стрес отговор) (Pacák and Palkovits, 2001). Стресът може да способства директно или индиректно за развитие или обостряне на редица патологични състояния, както и да стане причина за поведение, което повишава риска от дадено заболявания. Ето защо проблемът "стрес" придоби първостепенно значение в живота на съвременния човек.

Централната нервна система като цяло е директно или индиректно въвлечена в поддържането на вътрешната хомеостаза и участва в организирането на стрес-отговора. Известно е, че специфични мозъчни области имат важна роля в механизмите на този отговор. Сред тях са кората, хипокампът, амигдалата, *periaqueductal grey*, хипоталамусът, мозъчният ствол (Butler and Finn, 2009).

Стресът води до функционални и структурни промени в организма в резултат от сложното взаимодействие между ендокринната, имунната и централната нервна системи. По литературни данни стресогенни фактори (напр. имобилизация, висока или ниска температура) могат да модулират ендогенната опиоидна система (Pacák and Palkovits, 2001).

В условия на стрес се наблюдава понижаване на усета за болка – този феномен е добре проучен и известен в литературата като ***стрес-индуцирана аналгезия*** (СИА), която може да бъде предизвикана в експериментални условия чрез имобилизация, излагане на ниска или висока температура, принудително плуване и др. (Miczek et al., 1982; Teskey et al., 1984; Lester and Fanselow, 1985; Kavaliers and Innes, 1987; Kavaliers, 1990; Kavaliers and Colwell, 1991; Carrive et al., 2011).

Ендогенните опиоидна и канабиноидна системи, наред с адренергичната, серотонинергичната, азотноокисната и други, са сред основните, активиращи се и участващи в антистрес - отговора, като способстват за възстановяването на хомеостазата (Riedel, 2000).

Наред с тях интерес представляват и пептидите/невромодулатори в ЦНС. Ето защо е важно изясняване участието и взаимодействията им в някои патологични процеси и по-конкретно при стрес-индуцираната аналгезия.

До настоящия момент механизмите, лежащи в основата на аналгезията, предизвикана от имобилизационната и студова стрес-индуцирана аналгезия, все още са недостатъчно изучени.

В достъпната ни литература не намерихме данни относно ефектите от взаимодействието на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 и ендоканабиноидната система при стрес-индуцирана аналгезия.

В настоящия труд за измерване на ноцицептивните прагове бяха използвани два теста – с механичен стимул (*Paw-pressure test*) и с термичен стимул (*Hot-plate test*). Ноцицептивните измервания бяха проследявани във времето и отчитани на 10-та, 20-та и 30-та минута след въвеждане на веществата.

Имунохистохимично бяха изследвани мозъчни срезове от *periaqueductal gray*. Известно е участието на тази мозъчна област в контрола на болковата перцепция (Linnman et al., 2012; Wilson-Poe et al., 2013).

Използваните в настоящето изследване дози на пептидите (1 мг/кг за CB1-рецепторния агонист **анандамид** и 1,25 мг/кг за CB1-рецепторния антагонист ***AM*251**) бяха избрани след направена доза-отговор крива. Пептидите от семйството на Tyr-MIF-1 бяха въвеждани в доза 1 мг/кг. Всички вещества бяха въвеждани интраперитонеално.

Резултатите от нашето изследване показаха, че едночасовият имобилизационен и едночасовият студов стрес повишават болковия праг и удължават HP-латентността. Тези данни са в подкрепа на литературните, които показват, че и при двата вида стрес се наблюдава повишаване на аналгезията при *tail-flick и hot-plate* (Amir and Amit, 1978; Appelbaum and Holtzman, 1985; Galina and Kastin 1987; Kavaliers, 1987; Aloisi et al., 1998). Доказано е, че един от механизмите за аналгезията е свързан с отделяне при стрес на опиоидни пептиди, водещи до антиноцицептивни ефекти (Inoe et al., 2003).

Според други автори, след едночасов имобилизационен или студов стрес отделените ендогенни опиоидни пептиди потискат обратното захващане на норадреналин в някои зони на мозъка, напр. хипоталамуса и амигдалата на плъх.

Други автори доказват, че антиноцицепцията, предизвикана от имобилизационен стрес, се потенцира от опиоиди, което предполага, че поведенческите промени могат да бъдат свързани и с активирането на ендогенната опиоидна система по време на стрес (Watkins et al., 1982; Hayes and Katayama 1986).

Получените от нас резултати при студов стрес са в унисон с литературните данни, според които при него е повишена антиноцицепцията при *tail-flick* и *hot-plate* тестове (Galina and Kastin, 1987; Kavaliers, 1987).

Въвеждането на анандамид у животни без предшестващо излагане на стрес показа повишение на болковия праг, което бе по-отчетливо в сравнение с HP-латентността.

Известен е потискащият ефект на канабиноидите върху ноцицепцията (Martin et al., 1995, 1996, 1998; Hohmann et al., 1995; Walker et al., 1999). Системното въвеждане на канабиноиди потиска активността на болкочувствителните неврони в задния рог на гръбначния мозък (Hohmann et al., 1995) и в *nucl. ventro-posterior lateralis* на таламуса, без да променя активността на не-ноцицептивните неврони (Martin et al., 1996). Невро-физиологичните ефекти корелират с антиноцицептивните ефекти на канабиноидите и не могат да бъдат предизвикани от моториката, повлияна от някои веществата (Hohmann et al., 1995; Martin et al., 1996).

Доказана е и ролята на ендогенно освободения при физиологични условия анандамид в модулацията на болката (Walker et al., 1999).

Получените от нас резултати корелират с литературните данни и подкрепят участието на ЕКС в десцендентната противоболкова система.

PP-тестът след въвеждането на CB1-антагониста *N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyra-zole-3-carboxa-mide* или AM251 при интактни животни показва повишаване на болковия праг в сравнение с контролите. При HP-теста се наблюдаваше скъсяване на латентността за целия период на изследването.

Получените от нас резултати частично съвпадат с литературните данни. Въвеждането на AM251 скъси HP-латентността в сравнение с контролите през целия период на изследване, което съответства с преобладаващото схващане, че AM251 е антагонист/обратен агонист на CB1- рецепторите (Rinaldi-Carmona, 1994; Katsuyama et al., 2010).

При изследване на ноцицепцията чрез PP-теста се наблюдаваше временно увеличение на болковия праг на 10-та и 20-та мин. в сравнение с контролните стойности.

Следователно, AM251 повишава болковия праг, но скъсява HP-латентността спрямо интактни животни. Полученият резултат би могъл да се обясни, ако приемем, че AM251 действа и като *парциален агонист на CB1-рецептора,* но на този етап **<u>няма</u>** литературни данни.

Възможно е и друго обяснение, а именно, че ЕКС модулира негативно базалната активност на хипоталамо-хипофизо-надбъбречната (ХХН) ос, т.е. обуславя постоянен базален инхибиторен тонус на CB1-рецепторите върху базалното ниво на ХХН ос и респективно нивата на ГКС в организма (Finn, 2010). Възможно е блокирането на CB1-рецепторите от екзогенно въведения AM251 да намалява тоничната инхибиция на ХХН

ос, да повишава нивата на ГКС, което би довело до измереното временно повишаване на болковия праг.

Въвеждането на анандамид след едночасов ИС показа намаление на СИА и при двата теста (PP и HP). Анандамидът, въведен след студов стрес, повиши болковия праг при механичния тест. Ефектите при HP-теста не се различаваха от тези след имобилизационния стрес.

Известно е, че острият стрес предизвиква освобождаване на кортокотропин-освобождаващ фактор (КОФ) от паравентрикуларното ядро на хипоталамуса, който повишава секрецията на адренокортикотропен хормон (АКТХ) от аденохипофизата, който постъпва в системното кръвообращение и индуцира синтез и освобождаване на глюкокортикоиди от надбъбречната кора. У човека се отделя предимно кортизол, а у гризачите – кортикостерон.

ЕКС има ключова роля както при регулацията на базалното ниво на активност на ХХН ос, така и за прецизирането на отговора й по време на стрес, като модулира негативно нейната базална и индуцирана от остър стрес активност (Finn, 2010).

Редица автори изследват базалната активност на ХХН ос у трансгенни мишки, при които липсват CB1-рецептори (Haller et al., 2004a; Uriguen et al., 2004; Fride et al., 2005; Wade et al., 2006; Barna et al., 2007; Cota et al., 2007).

Независимо от някои несъответствия, дължащи се вероятно на разлики в опитните постановки и/или на различните линии животни и тяхното отглеждане, изводът е, че липсата на CB1-рецептори се съпътства от повишени плазмени нива на АКТХ, респ. на кортикостерон в началото на тъмния цикъл.

Отчетено е и нарушено потискане на АКТХ, респ. на кортикостерона, от ниски дози на дексаметазон (Cota et al. 2007). Изследванията подкрепят становището, че базалното ниво на ХХН ос е под тоничния инхибиторен контрол от страна на CB1-рецепторите, респ. от ендоканабиноидите.

Съществуват доказателства, че острият имобилизационен стрес предизвиква значимо намаление на нивото на анандамид в амигдалата и хипокампа на мишки (Patel et al., 2004, 2005b; Gorzalka et al., 2008). Авторите приемат, че стрес-индуцираното повишение на кортикостероидите предизвиква намаление на ендогенните канабиноиди по време на стрес.

Получените от нас резултати след имобилизационен стрес при двата теста и след студов стрес при термичния тест могат да се обяснят с потенциране на инхибиторното

въздействие на CB1-рецепторите върху ХХН ос от въведения екзогенен агонист, който намалява СИА.

Стрес-индуцираната аналгезия се състои от две компоненти – опиоидна и неопиоидна (Pacák and Palkovits, 2001; Lapo et al., 2003). При различните видове стрес те са различно застъпени. Известно е, че при студов стрес преобладава неопиоидната компонента, при топлинен стрес – опиоидната, а при имобилизационния стрес и двете компоненти са приблизително в еднакво съотношение (Pacák and Palkovits, 2001; Lapo et al., 2003).

С цел изучаване ефекта на анандамида при НР- теста след двата вида стрес направихме таблица с процентното понижаване на стрес-индуцираната аналгезия:

	на 10-та мин.	**на 20-та мин.**	**на 30-та мин.**
% понижение на СИА след 1 ч имобилизационен стрес + анандамид	-39,3	-25	-43,9
% понижение на СИА след 1 ч студов стрес +анандамид	-38,7	-15,4	-42,9

Резултатите показаха, че понижението на СИА след въвеждане на анандамид е по-силно след имобилизационен стрес на 20-та минута. Неочакваният на пръв поглед ефект би могъл да се обясни с постоянния базален инхибиторен тонус на CB1-рецепторите върху базалното ниво на ХХН ос и респективно нивата на ГКС в организма (Finn, 2010), от една страна, а от друга от значение е и фактът, че анандамидът при студов стрес проявява директен ефект върху CB1-рецепторите (Finn, 2010). Ето защо потискането на СИА се наблюдава при НР-теста.

Участието на неопиоидната компонента, в това число и на ендоканабиноидната система в развитието на СИА, е по-силно изразено при студовия стрес, което би могло да обясни по-слабото понижение на аналгезията, предизвикана от излагане на студ, в сравнение с тази след имобилизация, където и двете компоненти са еднакво изразени. Наблюдава се *U*-образен ефект на анандамида във времето.

Получените чрез РР-теста резултати след въвеждане на анандамид след 1 ч СС корелират с литературните данни, а именно че СИА е повишена след въвеждане на агонисти на CB1-рецепторите (Porter and Felder, 2001). В механизмите на развитие на С-

СИА преобладава неопиоидната компонента, което вероятно обуславя потенцирането й след въвеждане на CB1- рецепторен агонист.

При термичния тест се наблюдаваше намаляване на HP-латентноста през целия период на изследването.

Известно е, че пътищата на провеждане на болковата сетивността при PP- и HP-теста са различни, с което би могло да се обяснят разликите в отчетените резултати при двата теста. Трябва дасе има предвид и променената чувствителност на терморецепторите след студов стрес.

Въведен антагонистът на CB1-рецепторите AM251 понижи СИА и при двата вида стреса, както при PP, така и при HP-теста.

По литературни данни CB1-рецепторният антагонист SR141716A предизвиква температурна хиперaлгезия у мишки чрез NMDA-каналите (Richardson et al., 1998), а също така улеснява формалин-евокираното поведение у плъхове (Strangman et al.,1998). Уточнено е, че активирането на CB1-рецепторите върху пресинаптичните окончания на първичните аферентни неврони инхибира освобождаването на субстанция *P* (*SP*) и глутамат което е в основата на посочения ефект (Hohmann and Suplita, 2006; Pertwee, 2005). Известно е, че *SR141716A* представлява обратен агонист на *CB1* (Bouaboula et al., 1997).

Литературните данни показват, че AM251 притежава качества на антагонист и на обратен агонист на CB1-рецепторите, подобно на *SR141716A* (вж. Обзор, стр. 27, Графика 1). AM251 активира аденилатциклазата, увеличава потока през калциевите и намалява този през калиевите канали (Vasquez et al., 2003; Steffens et al., 2004). Някои автори предполагат, че в качеството си на обратен агонист на CB1-рецепторите AM251 предизвиква освобождаване на SP и глутамат, а вероятно и на азотен оксид (NO). Известно е, че NO улеснява синаптичната трансмисия между първичните аферентни неврони и клетките в задния рог на гръбначния мозък (Sakurada et al., 1996a,b, 2001; Okuda et al., 2001; Komatsu et al., 2007) и може да предизвиква хиперaлгезия (Kitto et al., 1992; Meller and Gebhart, 1993).

Получените от нас резултати са в подкрепа на литературните данни относно антагонизиращото действие на AM251 върху аналгезията (Steffens et al., 2004). При PP-теста AM251 е антагонист на CB1-рецепторите, докато при HP-теста той оказва ефект, характерен за обратен агонист на CB1-рецепторите (наблюдава се тенденция към хиперaлгезия), т.е. AM251 е едновременно и антагонист, и обратен агонист на CB1-рецепторите.

Както за анандамида, така и за AM251 обобщихме процентното понижение на имобилизационната и студовата СИА в следващата таблица:

	на 10-та мин.		**на 20-та мин.**		**на 30-та мин.**	
	PP	**HP**	**PP**	**HP**	**PP**	**HP**
% намаление на СИА след 1ч имобилизационен стрес +AM251	38,8	55,7	48,0	46,7	46,5	40,7
% намаление на СИА след 1ч студов стрес +AM251	43,3	**64,7**	31,1	**61,5**	34,5	**54,5**

От таблицата се вижда, че AM251 потиска СИА както при имобилизационния, така и при студовия стрес. По-значително е потисната студовата СИА в сравнение с имобилизационната, като **%-то й намаление** е най-значително при HP-теста**.**

От всичко това следва, че при студовата СИА участието на неопиоидната компонента е по-значително.

Ето защо въвеждането на антагониста/обратен агонист на CB1-рецепторите AM251 оказва по-значително намаляване на студовата СИА в сравнение с имобилизационната.

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

Ендогенните невропептиди MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 принадлежат към семейството на Tyr-MIF-1 и се отнасят към ендогенните антиопиоидни пептиди, открити в централната нервна система. Тяхното разпределение и специфичните им места за свързване съвпадат с това на опиоидните рецептори. Всеки един от четирите невропептида има способността да блокира и опиоидоподобни 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, 1992, 1993; Hackler et al., 1995). Те се свързват с опиоидни рецептори, както и със свои специфични места в мозъка.

MIF-1 е първият пептид с доказани антиопиоидни свойства. Той не свързва Tyr-MIF-1-свързващите участъци, както и опиоидните рецептори в мозъка на плъх (Luciano et al., 1981; Zadina et al., 1982; Zadina et Kastin, 1986). За сметка на това са открити свързващи MIF-1 участъци в стриатума, хипоталамуса и кората на плъх (Chiu et al., 1983).

Антиопиоидното действие на MIF-1 е доказано при различни животински видове, мишки (Dickinson and Slater, 1980; Kastin et al., 1984, 1985; Teskey and Kavaliers, 1985; Kavaliers and Hirst, 1986a, 1986b, 1986c), плъхове (Kastin et al., 1979, 1980; Yehuda et al., 1980; Galina and Kastin, 1985) и дори човек (Ehrensing et al., 1984). Наблюдавана е реверсия на ефекта както на екзогенните, така и на ендогенните опиоиди.

Tyr-MIF-1 притежава свързващ участък с висок афинитет, насищане и специфичност (Zadina et al., 1982). MIF-1 не се конкурира за този участък. Освен към собствения свързващ участък в мозъка, Tyr-MIF-1 се свързва по-слабо, но относително селективно към μ-опиоидните рецептори, като афинитетът му е 400-700 пъти по-висок към тях в сравнение с κ-рецепторите (Zadina et al., 1994).

Подобно на MIF-1, антиопиоидни ефекти притежава и Tyr-MIF-1. Той блокира аналгезията, предизвикана от морфин, както и топлинната СИА, но няма ефект върху неопиоидната СИА при плъхове. Аналгетичните ефекти при топлинна СИА са налоксон-зависими, докато при студовата налоксонът няма ефект (Kavaliers, 1988, 1990). В друга серия от опити бе показано, че Tyr-MIF-1 редуцира аналгезията при едночасов имобилизационен стрес (Bocheva and Dzambazova – Maximova, 2004, 2008), отчетено чрез *tail-flick*-тест и *hot-plate*-тест.

Наред с антиопиоидните, Tyr-MIF-1 притежава и опиоидни ефекти. Способността му да свързва опиоидните рецептори съответства на силата на ефекта, като е налице селективен афинитет предимно към μ-, и по-слабо към δ- и κ- рецепторите. При понижаване количеството на опиоидните рецептори Tyr-MIF-1 действа като антагонист на инхибиращите ефекти на опиатите. Това е в съответствие с неговите антиопиоидни ефекти. Подобно двойнствено действие е съвместимо, ако приемем Tyr-MIF-1 като частичен агонист на μ-рецепторите с относително ниска вътрешна активност и афинитет (сравнен напр. с ендоморфините).

В опити *in vivo* Tyr-MIF-1 показва изразен противоболков ефект (Bocheva et al., 2004). В антиноцицептивните ефекти на пептидите участват азотноокисната, хистаминергичната и адренергична системи (Bocheva et al., 2003, 2004).

Известно е, че Tyr-W-MIF-1 се свързва с местата за Tyr-W-MIF-1, но не и с тези за Tyr-K-MIF-1. Опиоидите не се свързват към този участък (Zadina et al., 1990b). По отношение на μ-опиоидния рецептор, Tyr-W-MIF-1 е по-мощен сравнение с Tyr-MIF-1 по отношение инхибиране на свързването на DAMGO. Пептидът е 200 пъти по-селективен по отношение на μ-, в сравнение с κ- и δ- опиоидните рецептори (Zadina et al., 1994), но свързващата му активност е като цяло по-ниска в сравнение с класическите опиати. Tyr-W-MIF-1 свързва както μ_1-, така и μ_2- подклас опиоидни рецептори (Zadina et al., 1996).

Tyr-W-MIF-1 антагонизира морфиновата аналгезия (Gergen et al., 1996) и понижава в дозо-зависима степен индуцираната от морфина обратна регулация на μ- и δ-рецепторите в човешки невробластомни клетки (Harrison et al., 1998). Пептидът не променя рецепторния брой, така че вероятно се отнася като парциален агонист. Притежава по-ниска ефективност от морфина по отношение на μ-рецептора, като свързва μ_1–опиоидните рецептори, но не притежава достатъчно ефективност за индуциране на аналгетичен отговор При по-високи дози обаче може да се конкурира с морфина и да прояви собствена опиоидна активност.

Tyr-W-MIF-1 понижава индуцираната от имобилизационен стрес антиноцицепция, измерено чрез PP-теста (Bocheva and Dzambazova-Maximova, 2004b). Антиопиоидният ефект е по-силен, когато тетрапептидът се инжектира след излагане на стрес. Tyr-W-MIF-1 също така понижава морфиновия аналгетичен ефект при тестовете *tail-flick* и PP-теста (Bocheva and Dzambazova-Maximova, 2004a).

Tyr-W-MIF-1 индуцира обратима от налоксон аналгезия след интрацеребровентрикуларно или интратекално въвеждане (Zadina et al., 1993; Gergen et al., 1996). Счита се, че ефектът е предимно μ_2-медииран, докато антиопиоидните ефекти са опосредствани от μ_1-участъци (Fisher et al., 2006).

Подобно на Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1, Tyr-K-MIF-1 също свързва участъците за Tyr-MIF-1, където традиционните опиати са неактивни (Hackler et al., 1994). Tyr-K-MIF-1 притежава свое уникално свързващо място (Hackler et al., 1994), като налоксонът, *DAMGO*, Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1 са без ефект в този участък.

За разлика от Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1, както и други, съдържащи *Tyr-Pro*-пептиди (хеморфин, цитохрофин, морфицептин и др.), Tyr-K-MIF-1 не свързва опиоидните рецептори в дози до 300 μM (Hackler et al., 1994).

Tyr-K-MIF-1, подобно други членове на семейството на Tyr-MIF-1, понижава аналгетичния ефект на морфина при интраперитонално инжектиране 20 минути по-

късно в доза от 1мг/кг (Bocheva and Dzambazova-Maximova, 2004a). При индуцирана от имобилизационен стрес антиноцицепция Tyr-K-MIF-1 има антиопиоиден ефект при инжектиране един час след стреса (Bocheva and Dzambazova-Maximova, 2004a, b).

При интраперитонеално въвеждане по време или един час преди имобилизационен стрес, Tyr-K-MIF-1 увеличава аналгезията (Bocheva and Dzambazova-Maximova, 2004a, b). Инжектиран самостоятелно, Tyr-K-MIF-1 индуцира дозо-зависима краткотрайна аналгезия, която се премахва от налоксон (Hackler et al., 1994). Тъй като Tyr-K-MIF-1 е неактивен в тънко черво на морско свинче и не се свързва към опиоидните рецептори се предполага, че тетрапептидът повишава болковия праг чрез индиректно активиране на опиоидната система, което води до освобождаване на хистамин и стимулиране на постсинаптичните хистаминергични рецептори, което предполага участие на хистаминергичната система (Zamfirova et al., 2007).

Известно е, че стресът предизвиква аналгезия, в чиито механизми участват опиоидна и неопиоидна компонента (Miczek et al., 1982; Teskey et al., 1984; Lester and Fanselow, 1985; Kavaliers and Innes, 1987; Kavaliers, 1990; Kavaliers and Colwell, 1991).

Ендоканабиноидната система е част от неопиоидната компонента на СИА, която е и обект на дисертационния труд.

Относно пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 е известно, както бе отбелязано вече, че притежават опиоидни и антиопиоидни ефекти при определени условия. Те потискат СИА, предизвикана от имобилизационен, студов или топлинен стрес.

Ето защо за нас интерес представляваше да се изучат ефектите на **всеки един от пептидите на семейството на Tyr- MIF-1** върху ЕКС в условия на стрес.

Въвеждането на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 съвместно с анандамид след имобилизационен стрес промени СИА. На 30-та мин. от изследването и четирите пептида, въведени след анандамид, паказаха по-нисък болков праг и скъсена НР-латентност спрямо имобилизационния стрес.

MIF-1, въведен съвместно с анандамид след имобилизационен стрес, понижи ноцицепцията от началото до края на изследвания период и при двата използвани теста.

При съвместното въвеждане с анандамид Tyr-MIF-1 показа *U*-образен ефект върху ноцицепцията и при двата теста.

Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 показаха на 10-та мин. по-висок болков праг в сравнение както с имобилизационния стрес, така и с имобилизационен стрес+анандамид, като Tyr-K-MIF-1 притежаваше по-висок болков праг.

Tyr-W-MIF-1 свързва рецепторите за Tyr-MIF-1, но не и тези за Tyr-K-MIF-1; по отношение на опиоидните рецептори, пептидът свързва μ-рецепторите с по-голям афинитет от Tyr-MIF-1.

Различието в рецепторното свързване на четирите пептида вероятно обуславя разликите в биологичните им ефекти.

Въвеждането на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 съвместно с анандамид след студов стрес показа сходни резултати с тези при ИС.

Стойностите на СИА бяха понижени, спрямо тези на СС при термичния тест за целия период на изследването.

MIF-1, Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1 проявиха потискащ ефект още на 10-та мин., а Tyr-K-MIF-1 на 20-та мин. от изследването спрямо СС+анандамид.

Фармакологичните ефекти на опиоидите се осъществяват чрез различни опиоидни рецептори –μ, δ, κ, λ, σ, ε и др. (Singh et al., 1997).

Канабиноидите и опиоидите представляват две отделни групи психотропни вещества, които изявяват сходни ефекти по отношение на аналгезията, седацията, хипотермията и инхибирането на моториката (Manzaneres et al., 1999; Massi et al., 2001; Varvel et al., 2004). Освен това техните рецептори осъществяват действието си чрез сходни вътреклетъчни механизми - предимно потискане образуването на цАМФ чрез активиране на G_i-протеини (Bidaut-Russell et al., 1990; Childers, 1991).

Засега са идентифицирани два вида канабиноидни рецептори – CB1 и CB2. Първите са разположени предимно в ЦНС, докато вторите – върху имунни клетки, микроглия, мастоцити и ретина на плъх (Lu et al., 2000; Pertwee, 2001; Howlett et al., 2002; Samson et al, 2003; Carrier et al., 2004).

В последните години интерес предствлява изучаване взаимодействието между канабиноидите и опиоидната система по отношение на ноцицепцията (Welch and Eads, 1999; Finn et al., 2004).

Едни от първите опити в това отношение е показал, че ефектът от съвместното венозно приложение на Δ9-ТХК и морфин е по-голям отколкото би бил „простият сбор” от ефектите на двете вещества, приложени поотделно. В конкретния случай са били приложени субефективни дози и е отчетен значителен аналгетичен ефект. Ефектът е бил медииран съвместно от μ- и CB1-рецептори, тъй като приложение на селективни μ- или CB1-рецепторни антагонисти изцяло го блокира (Reche et al., 1996). По-късно е било доказано потенциращото действие на Δ9-ТХК върху ефекта на морфина и кодеина чрез *tail-flick test* (Smith et al., 1998; Cichewicz et al., 1999). Доказано е, че ендогенни опиоидни

пептиди се отделят след интратекално въвеждане на Δ9-ТХК (Pugh et al., 1996). По-късно е доказано, че Δ9-ТХК и левонантрадолът потенцират аналгетичния ефект на морфина чрез отделяне на съответно на динорфин *A* и *B* (Welch and Eads, 1999).

Така се оформя становището, че антиноцицептивното действие на опиоидите е под контрола на ендоканабиноидите. Хипотезата се подкрепя и от експериментални доказателства за блокиране на канабиноид-индуцираната аналгезия от антагонисти на опиоидните рецептори (Cox and Welch, 2004).

Според някои автори канабиноидното повлияване зависи от базалния ендогенен опиоиден тонус. Неговото понижение, напр. при предизвикване на диабет у плъхове, води до понижение на ефекта на морфина. Въвеждането на Δ9-ТХК подобрява способността за отделяне на ендогенни опиоиди у животни с диабет, с което се поддържа аналгетичният ефект на морфина. Освен това е доказано, че ефектът на Δ9-ТХК е по-изразен при животни с диабет, в сравнение със здрави контроли (Williams et al., 2008).

Всичко казано дотук налага ревизия на отношението ни към канабиноидите. Те имат значителна роля при различни състояния, свързани с остра и хронична болка (Maione et al., 2006; La Rana et al., 2006; Palazzo et al., 2006; Degroot and Nomikos, 2007).

Получените резултати при съвместно въвеждане на анандамид и MIF-1 след стрес показват потискане на СИА и при двата вида стрес, като антагонизиращият ефект на пептида след имобилизация е по-силно изразен в сравнение със студовия стрес, при който преобладава неопиоидната компонента. Получените резултати имат косвена подкрепа и от някои литературни данни, при които е показано, че MIF-1 антагонизира СИА при принудително плуване в топла, но не и в студена вода (Pan et al., 2007).

Съвместното въвеждане на анандамид и Tyr-MIF-1 след стрес показва потискане на СИА и при двата вида стрес, като антагонизиращият ефект на пептида е изразен на 20-та мин. и е по-силно изразен след имобилизационен стрес.

Ефектите на Tyr-MIF-1 се медиират от μ- и κ-опиоидните рецептори, както и от собствени неопиоидни рецептори. Редица автори показват, че пептидът има ефект при психо-социален стрес-, *footshock*-индуцирана аналгезия, както и при индуцирана от принудително плуване аналгезия (Fukunaga et al., 1999).

Съвместното въвеждане на Tyr-W-MIF-1 и анандамид след стрес показа статистически значимо повишение на болковия праг след имобилизационна и след студова СИА.

Известно е, че при имобилизационната СИА по-голямо е участието на опиоидната компонента в сравнение със С-СИА. Опиоидните ефекти на Tyr-W-MIF-1 са μ_2-медиирани, антиопиоидните са предимно μ_1-зависими (Fisher et al., 2006). Наред с опиоидните рецептори той има свързвания и с неопиоидни места. Опиоидното свързване е предимно с μ- (както μ_1, така и μ_2), отколкото с δ- и κ- рецепторите. Неопиоидното свързване е в местата за Tyr-MIF-1, но не и в тези за Tyr-K-MIF-1 (Zadina et al., 1990b).

Разликите в свързването на пептида, от една страна, и различното участие на опиоидната и неопиоидната компоненти в развитието на имобилизационно- и студово-индуцираната аналгезия, от друга, обясняват различното потенциране при двата вида СИА. Ние предполагаме, че по-продължителният ефект след имобилизацията е обусловен от по-силното свързване с μ_2-опиоидните рецептори (Fisher et al., 2006) за разлика от MIF-1 и Tyr-MIF-1, при които подобно свързване не е документирано.

Получените резултати се подкрепят и от данните за индуцирана от Tyr-W-MIF-1 обратима от налоксон аналгезия след интрацеребровентрикуларно и интратекално въвеждане (Zadina et al., 1993; Gergen et al., 1996).

Първоначалната аналгезия бе последвана от понижение на болковия праг, отчетен и чрез двата метода (PP и HP). Болковите прагове бяха по-ниски след СС в сравнение с ИС. Получените резултати биха могли да се дължат на по-голямото участие на опиоидната компонента в механизмите на И-СИА в сравнение със С-СИА, както и на различното участие и разпределение на μ-рецепторните подтипове, обуславящи антиопиоидните ефекти на пептида.

Съвместното приложение на Tyr-K-MIF-1 с анандамид след стрес показа статистически значимо повишение на болковия праг след имобилизационна, но не и след студова СИА, при която болковият праг остана съизмерим с този след студов стрес. Полученият резултат след имобилизация се дължи вероятно на свързването на Tyr-K-MIF-1 с местата за Tyr-W-MIF-1, който също показва изразен аналгетичен ефект на 10-та мин. от експеримента.

За разлика от него на 20-та мин. след Tyr-K-MIF-1 се отчита статистически достоверно понижение на болковия праг. По всяка вероятност причината за този ефект е свързването на Tyr-W-MIF-1 с μ_2-опиоидните рецептори (Fisher et al., 2006).

Получените резултати за Tyr-K-MIF-1 след студов стрес се различават значително от тези за Tyr-W-MIF-1. Възможно обяснение би могло да бъде различното рецепторно свързване на двата пептида и по-конкретно свързването на Tyr-K-MIF-1 към своите специфични места, към които останалите три изследвани пептида нямат

отношение (Hackler et al., 1994). Термичният метод за определяне на НР-латентността подкрепя подобна хипотеза, тъй като при него се наблюдаваше удължаване на НР-латентността на 10-та мин. в сравнение със студовия стрес+анандамид, за разлика от останалите три пептида, при които НР-латентността бе скъсена.

Описаните ефекти биха могли да се обяснят със съвместото локализиране на рецепторите за двете групи вещества върху едни и същи неврони. С помощта на *in situ* хибридизационни, авторадиографски и имунохистохимични изследвания е доказано значението на PAG за ноцицепцията (Mailleux and Vanderhaeghen, 1992; Kalyuzhny et al., 1996; Tsou et al., 1998; Commons et al., 2000; Abrams et al., 2011).

Известно е, че както CB1-, така и μ-опиоидните рецептори представляват *G*-протеин-свързани рецептори, които взаимодействат предимно с *Gi/Go*-протеини (Connor and Christie, 1999; Howlett et al., 2002). Активирането и на двта вида рецептори инхибира аденилатциклазата, което се проявява с намалена продукция и акумулиране на цикличен АМФ (Howlett, 1985; Childers et al., 1992; Meng and Johansen, 2004).

Наред с това митоген-активираните протеин киназни (МАПК) каскади се модулират както от CB1-, така и от μ-опиоидните рецептори (Howlett, 2005; Asensio et al., 2006). Според някои автори важно конвергиращо звено на опиоид-канабиноидното взаимодействие би могла да представлява екстрацелуларно-свързаната киназа 1 и 2 (Macey et al., 2009).

Доказано е, че високостепенната ко-локализация на CB1- и μ-опиоидните рецептори в мозъка е свързана с десцендентната модулация на болковата перцепция (Wilson-Poe et al., 2012).

Известно е че, стресогенните фактори повишават нивата на опиоидите, катехоламините и азотния оксид (D'Arbe et al., 2002; Esch T et al., 2002).

С оглед конкретизиране на ефектите от взаимодействието между ЕКС и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 бе въвеждан антагонистът/обратен агонист на CB1-рецепторите – AM251.

Съвместното приложение на AM251 и MIF-1 показа сходни резултати след двата вида стрес. На 10-та мин. след ИС бе регистриран понижен болков праг както спрямо ИС, така и спрямо ИС+анандамид. През останалия период болковият праг бе повишен спрямо ИС+анандамид, но остана по-нисък спрямо ИС. Непосредствено след прекратяване на СС болковият праг бе съизмерим със СС, но по-висок от този на СС+анандамид. През останалия период болковият праг бе както след ИС - по-нисък

спрямо стреса, но по-висок спрямо стрес+анандамид. Сходни бяха и измерените стойности на НР-латентността след двата вида стрес.

Получените резултати показват, че MIF-1 потиска по-силно стрес-индуцираната аналгезия след имобилизационния, в сравнение със студовия стрес.

В сравнение с приложението на MIF-1 с анандамид след стрес, въвеждането на пептида с AM251 показа на 20-та и 30-та мин. по-високи болкови прагове и удължена НР-латентност след ИС. Подобна тенденция бе отчетена и след СС на 10-та мин. при механичния метод и на 20-та – за термичния.

Получените резултати показват, че MIF-1 имо по-силен потискащ ефект при имобилизационния стрес в сравнение със студовия.

Съвместното приложение на AM251+Tyr-MIF-1 след двата вида стрес показа понижение на болковия праг, по-силно изразено след студовия стрес, както и скъсяване на НР-латентността спрямо двата вида стрес, също по-силно изразена след студовия стрес.

Въведен Tyr-MIF-1+AM251 след имобилизация повиши болковия праг в сравнение с този на Tyr-MIF-1 с анандамид. При СС Tyr-MIF-1+AM251 понижи болковия праг по-силно в сравнение с Tyr-MIF-1 с анандамид.

Последни изследвания показват, че AM251 е директен антагонист и на μ-опиоидните рецептори (Seely et al., 2012). Ако приемем, че антиопиоидният ефект на пептида е поне отчасти μ-медииран, блокирането на тези рецептори от антагониста на CB1-рецепторите би обяснило и понижения антиопиоиден ефект на Tyr-MIF-1 при И-СИА.

Съвместното въвеждане на Tyr-W-MIF-1 с AM251 след ИС показа начална тенденция към понижение на болковия праг още на 10-та мин. и статистически достоверно по-ниски прагове през целия останал перод на изследване, докато след СС бе отчетена краткотрайна тенденция към повишение на болковия праг, който остана съизмерим с този след СС през останалия период на проследяване. Резултатите от термичния тест след двата вида стрес бяха сходни.

От казаното е ясно, че антиопиоидният ефект на Tyr-W-MIF-1 е по-изразен при съвместно въвеждане с *AM*251 след ИС, отколкото след СС.

В сравнение с приложението след анандамид, съвместното въвеждане на Tyr-W-MIF-1 с AM251 показа, че измереният след анандамид аналгетичен ефект се антагонизира от AM251 и след двата вида стрес. Болковият праг след ИС бе по-висок в абсолютни стойности в сравнение със СС, като процентното намаление след въвеждане

на AM251 бе също така по-голямо след ИС (-32,5%), в сравнение със СС (-20,5%).

Сложността в тълкуването и обяснението на получените резултати от съвместното приложение на Tyr-W-MIF-1 с AM251 се дължи, от една страна, на различните ефекти (опиоидни и неопиоидни) на пептида, а, от друга, на различното съотношение между опиоидната и неопиоидната компоненти в развитието на СИА след двата вида стрес. При интерпретацията на получените резултати трябва дасе вземе прадвид и доказаният ефект на *AM*251 като директен антагонист на μ-опиоидните рецептори (Seely et al., 2012).

Съвместното въвеждане на Tyr-K-MIF-1 с AM251 след стрес показа много интересни и различни от описаните до момента резултати. Болковият праг бе повишен след двата вида стрес, като след ИС повишението бе отчетено още на 10-та мин., а на 20-та мин. от изследването бе измерено допълнително покачване на болковия праг и понижението му на 30-та мин. спрямо ИС. HP-латентността на 20-та и 30-та мин. бе удължена спрямо тази след ИС.

След СС повишение на болковия праг бе отчетено на 20-та и на 30-та мин. от изследването спрямо СС. Повишението на болковия праг при СС бе по-ниско в абсолютни стойности в сравнение от това при ИС.

Получените резултати показват, че съвместното въвеждане на Tyr-K-MIF-1 с AM251 след стрес се проявява с по-високи болкови прагове след ИС в сравнение със СС.

В сравнение с въвеждането на Tyr-K-MIF-1 с анандамид, съвместното му въвеждане с AM251 след ИС показа удължаване на аналгетичния му ефект, отчетено и при двата теста. След СС аналгетичният ефект се прояви по-късно и само при PP-теста.

Посоченият ефект вероятно се дължи на свързването на Tyr-K-MIF-1 със своите неопиоидни места, с които останалите три пептида не се свързват.

Допълнително уточняване на участието на опиоидната компонента в механизмите на взаимодействие между ЕКС и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 бе направено чрез въвеждане на антагонист на опиоидните рецептори.

Данните относно ефекта на неселективния опиоид-рецепторен антагонист налоксон върху СИА са противоречиви. При *tail-flick* и *hot-plate* той редуцира инхибицията на отговорите при ИС, което показва участието на опиоидните рецептори (Amir and Amit, 1978).

Според други изследвания налоксонът не променя латентния период, т. е. опиоидните рецептори не участват в ноцицептивния отговор (Kiyatkin, 1989). Някои

автори показват, че той няма ефект върху С-СИА (Kavaliers, 1987), а според други, налоксонът, въведен преди СС, блокира дозо-зависимо аналгезията (Vaswani et al., 1987).

В нашите експерименти налоксонът, въведен съвместно с анандамид след ИС, не промени статистически достоверно както болковия праг, така и НР-латентността за целия период на изследването в сравнение с тези след ИС.

Резултатите са обясними, имайки предвид участието на ЕКС в неопиоидната компонента в механизма на развитие на СИА, от една страна, и по-слабото участие на неопиоидната компонента в механизмите на И-СИА в сравнение със С-СИА. Обратно, съвместното въвеждане на анандамид след налоксон и СС доведе до понижение както на болковия праг, така и на НР-латентността през първите 20 мин. от изследването.

Данните за потискащия ефект на налоксона върху канабиноидно-обусловената аналгезия датират от 1994 г. (Welch, 1994; Reche et al., 1996a). Описан е и синергичният антиноцицептивен ефект на опиоидната и ЕКС (Pugh et al., 1996; Welch and Eads, 1999).

По същото време е доказано, че аналгетичният ефект на ендоканабиноидите се дължи на предизвикване отделянето на опиоидни пептиди (Reche et al., 1996b). Налице са доказателства, че както μ-опиоидни (Helmstetter and Fanselow, 1987), така и CB1-рецепторни антагонисти (Finn et al., 2004) напълно премахват някои форми на СИА. В по-нови изследвания се предлага хипотезата за образуване на μ / CB1 хетеродимери (Rios et al., 2006).

Получените от нас резултати подкрепят литературните данни за участие на опиоидите в механизма на канабиноид-индуцираната аналгезия.

При изследване взаимодействието между ЕКС и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1, въвеждането на налоксон показа значителни промени на болковия праг и НР-латентността.

Въвеждане на налоксон с анандамид и пептиди след ИС показа краткотрайно понижение на болковия праг при Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1, в чиито ефекти се предполага участие на μ-опиоидни рецептори, както и на Tyr-K-MIF-1, за който е известно, че не свързва опиоидни рецептори (Hackler et al., 1994), а упражнява ефектите си чрез свое специфично място и това за Tyr-MIF-1 (Hackler et al., 1994).

Въвеждането на MIF-1 след ИС+анандамид повиши болковия праг и удължина НР-латентността през целия период на проследяване, като болковият праг на 10-та мин. бе статистически достоверно по-висок от този за ИС. MIF-1 не се свързва с опиоидни рецептори (Luciano et al., 1981; Zadlna et al., 1982; Zadina and Kastin, 1986). Той реализира антиопиоидните си ефекти посредством свързващи места с най-висока

концентрация в стриатума и по-ниска в хипоталамуса и кората (Chiu et al., 1983). В някои отношения самият пептид наподобява ефекти на налоксона (Krause et al., 1984; Pulvirenti and Kastin, 1988).

Ефектът от съвместното им въвеждане би могъл да се дължи на блокиране в условия на ИС и в присъствие на агонист на CB1-рецепторите, от една страна и на налоксон от друга на рецептори, отговорни за антиопиоидните ефекти на пептида.

Повишение на болковия праг при съвместно въвеждане на MIF-1 с налоксон и анандамид бе наблюдавано и след СС, където на 10-та мин. бе отчетена тенденция към по-висок болков праг спрямо С-СИА. Измерено бе и удължаване на НР-латентността на 10-та и 20-та мин. Посочените ефекти на налоксона след СС бяха по-слабо изразени и краткотрайни в сравнение с ИС, което съответства на по-слабото участие на опиоидната компонента в обуславянето на СИА при СС в сравнение с ИС.

Описаните при ИС ефекти на налоксона по отношение на болковия праг и НР-латентността след въвеждането на Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 съвместно с анандамид не се наблюдаваха след СС, което се обяснява с тяхната вероятна μ-медииираност, от една страна, и по-слабото участие на опиоидната компонента в механизмите на С-СИА, от друга.

Едновременното блокиране на CB1-рецепторите и μ-опиоидните рецептори не промени статистически достоверно болковия праг и НР-латентността спрямо ИС+ AM251, но показа допълнително понижение на прага на болката през целия период спрямо СС+AM251, както и скъсяване на НР-латентността на 10-та мин. спрямо СС+AM251.

След съвместно въвеждане на MIF-1 с AM251 и налоксон след ИС бе отчетено краткотрайно повишение на болковия праг, както и удължаване на НР-латентността през целия период на проследяване в сравнение със стойностите на ИС+AM251 и съответния пептид, като на 20-та и 30-та мин. от изследването НР-латентността бе удължена и спрямо ИС, но без да достигнат контролните стойности. Подобен ефект не бе наблюдаван след СС.

Описаният краткотраен аналгетичен ефект след въвеждане на анандамид и MIF-1 след налоксон е по-силно изразен при ИС в сравнение със СС и не се наблюдава след AM251.

Въведени Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 съвместно с AM251 и налоксон след ИС понижиха болковия праг спрямо ИС+AM251 и съответния пептид през целия проследен период. НР-латентността бе скъсена след Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 на 10-

та мин. Отчетеното понижение на болковия праг бе статистически достоверно по-голямо от понижението на болковия праг след въвеждане на анандамид, налоксон и пептида след ИС. Резултатите подкрепят участието на опиоидната компонента в съвместния ефект на ендоканабиноидите и Tyr-MIF-1 пептидите върху ноцицепцията.

Резултатите след СС показват понижение на болковите прагове след Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1, въведени с AM251 и налоксон, спрямо стойностите без налоксон. При СС е застъпена предимно неопиоидната компонента в развитието на СИА, поради което налоксонът не промени болковия праг при въвеждане на двата пептида (в чиито аналгетични ефекти се приема участието на опиоидни рецептори) с анандамид, но след блокиране и на CB1-рецепторите (т. е. на неопиоидната компонента) бе отчетено понижение на болковия праг.

При Tyr-K-MIF-1, който притежава собствен участък на свързване и реализира своите ефекти не само чрез опиоидните рецептори, въвеждането след СС+налоксон+ AM251 и краткотрайно повиши болковия праг до стойност, съизмерима с тази на СС, от една страна, и на СС+анандамид+пептид, от друга.

Следователно, ЕКС и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 повлияват СИА след имобилизационен и студов стрес. В механизмите на развитие на СИА пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 повлияват ЕКС т. е. реализират своити антиопиоидни ефекти. Те зависят, от една страна, от участието на опиоидната и неопиоидната компоненти в при СИА (имобилизационна или студова), а от друга страна, от взаимодействието между различните рецептори, ангажирани в медиирането на ефектите.

За хистохимичните експерименти бе избрана *periaqueductal grey* на плъх, тъй като е доказано участието й в медиацията и модулацията на болковата перцепция.

Известно е, че стресът води до функционални и структурни промени в организма в резултат от сложното взаимодействие между ендокринната, имунната и централната нервна системи.

Както едночасовата имобилизация, така и едночасовата студова експозиция повишават КОФ в *nucleus paraventricularis* на хипоталамуса (Costa et al., 1993; Karanth et al., 1993; Hori et al., 2004), т. е. активират ХХН ос (Uribe et al., 1999; Gotti et al., 2005).

Литературните данни от последните години показаха, че канабиноидната система е широко застъпена в мозъчните региони, свързани с отговора към стрес.

Известно е, че ендоканабиноидната система е широко разпространена невромодулаторна/невротрансмитерна система, играеща съществена роля в регулацията на синаптичната трансмисия.

CB1-рецепторите са широко разпространени в мозъка (Herkenham et al., 1991; Tsou et al., 1998 a, b; Moldrich and Wenger, 2000) и имат по-ниски нива на експресия в периферни тъкани (кръвоносни съдове, имунни клетки и репродуктивни тъкани) (Parolaro, 1999; Hillard, 2000; Gorzalka and Hill, 2006).

CB1-рецепторът е експресиран от субпопулации глутамат-, ГАМК-, ацетилхолин, серотонин- и норадренергични неврони (Nakazi et al., 2000; Ohno-Shosaku et al., 2001; Schlicker and Kathmann, 2001), което показва, че канабиноидите притежават способността да потискат освобождаването на много невротрансмитери/ невромодулатори.

Области със значителна плътност на CB1-рецептори са хипокампът, префронталният кортекс, амигдалата, хипоталамусът и моноаминергичните ядра на средния мозък, като *locus coeruleus* и *raphe dorsalis* (Herkenham et al., 1991; Tsou et al., 1998a,b).

Счита се, че канабиноидната система регулира невроналната активност чрез анатомични кръгове, въвлечени в отговора към стреса и чрез способността й да модулира невротрансмитерното освобождаване (Gorzalka et al., 2008).

В *in vivo* експерименти е показано преходно покачване на съдържанието на два CB1-рецепторни агонисти – анандамид и 2-арахидоноилглицерол в PAG след *foot-shock* стрес (Hohmann et al., 2005). По всяка вероятност след стресогенен стимул следва бързо активиране на ендоканабиноидното освобождаване (Hillard and Jarrahian, 2005). Съществуват данни, че инжектирането на CB1-рецепторен антагонист в нестресирани животни води до дозо-зависимо активиране на ХХН ос (Manzaneres et al., 1999; Patel et al., 2004; Wade et al., 2006). Тези данни показват, че CB1- рецепторите имат ключова роля в регулацията на ХХН ос в условията на остър стрес.

Стимулирането на опиоидните рецептори в PAG активира низходящите пътища, потискащи ноцицепцията (Moreira et al., 2009). Имунохистохимични данни показват, че CB1-рецепторите са представени с умерена плътност в тази област (Herkenham et al., 1991; Tsou et al., 1998a). Въвеждането на CB1-рецепторни агонисти повишава *fos*-експресията и мозъчната метаболитна активност в PAG на плъхове, което предполага участието на тази структура в ефектите на системно въведени канабиноиди (Moreira et al., 2009). Освен това, субкутанното инжектиране на формалин (болков стимул), значително повишава освобождаването на анадамид в PAG (Walker et al., 1999; Hohmann and Suplita 2006).

Известно е, че бързата индукция на канабиноидната невротрансмисия в PAG медиира неопиоидната стрес-индуцирана аналгезия (Hohmann et al., 2005). Съществуват доказателства, че опиоидите и канабиноидите модулират синаптичната трансмисия и продуцираната аналгезия в дорзолатералните, латералните и вентролатералните ядра на PAG (Paton, 1975; Zuardi, 2006).

Следователно, може да се предположи, че съществува взаимодействие между тези две системи, в частност поради синергизма между опиоиди и канабиноиди (Courtwright, 2001).

До този момент ***в достъпната ни литература не намерихме данни*** относно влиянието на имобилизационния и студовия стрес върху експресията на CB1-имунореактивните неврони в PAG.

Нашите резултати показаха, че едночасовият имобилизационен и едночасовият студов стрес повишават експресията на CB1-имунореактивните неврони в PAG в сравнение с контролите без стрес.

След като бяха установени количествените разлики в експресията на CB1-рецепторите в условия на имобилизационен и студов стрес, изучихме и ефектите на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху експресията на CB1 в PAG.

Получените от нас резултати показаха, че пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 понижават експресията на CB1-имунореактивните неврони в PAG.

ИЗВОДИ

1. Пептидите MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени съвместно с анандамид, понижават имобилизационната и студовата стрес-индуцирана аналгезия при двата използвани теста;

2. Пептидът MIF-1, въведен с анандамид или с *AM*251, показва най-силен потискащ ефект върху имобилизационната СИА при двата използвани теста;

3. Пептидите MIF-1, Tyr-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени с анандамид, проявяват най-силен потискащ ефект върху студовата СИА и при двата използвани теста;

4. Опиоидергичната система участва в ефектите на пептидите MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 върху канабиноидната система при имобилизационна и студова стрес-индуцирана аналгезия;

5. Опиоидната система повлиява по-силно ефектите на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху ендоканабиноидната система при имобилизационния в сравнение със студовия стрес.

6. Стресът, индуциран от имобилизация или ниска температура, повишава броя и експресията на CB1-реактивните неврони в PAG в сравнение с контролната група животни;

7. Пептидите MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след имобилизационен или студов стрес, понижават в различна степен броя и експресията на CB1-реактивните неврони в PAG;

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

ПРИНОСИ

- Установено бе, че пептидите MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени съвместно с анандамид, понижават имобилизационната и студовата стрес-индуцирана аналгезия;

- Установено бе, че антиопиоидният ефект на MIF-1 съвместно с анандамид е по-силно изразен след имобилизационен стрес в сравнение със студов;

- Установено бе, че опиоидергичната система участва в ефектите на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху ендоканабиноидната система в условия на стрес, като влиянието е по-силно изразено при имобилизационния стрес в сравнение със студовия;

- Установено бе, че пептидите от семейството на Tyr-MIF-1, въведени след имобилизационен или студов стрес, понижават в различна степен броя и експресията на CB1-реактивните неврони в *PAG*.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Abdulhameed SM, Feigal RJ, Rudney JD, Kajander KC (1989) Effect of peripheralelectrical stimulation on measures of tooth pain threshold and oral soft tissue comfort in children. Anesth Prog, 36: 52–57.

2. Abrams DI, Couey P, Shade SB, Kelly ME, Benowitz NL (2011) Cannabinoid–opioid interaction in chronic pain. Clin Pharmacol Ther, 90: 844–851.

3. Adams R (1942) Marihuana. Harvey Lect, 37: 168–197.

4. Ahn K, McKinney MK, Cravatt BJ (2008) Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. Chemical Reviews, 108: 1687-1707.

5. Aimone LD, Bauer CA, Gebhart GF (1988) Brain-stem relays mediating stimulation-produced antinociception from the lateral hypothalamus in the rat. J Neurosci, 8: 2652–2663.

6. Akil H, Madden J, Patrick RL, Barchas JD (1976a) 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, 63–70.

7. Akil H, Mayer DJ, Liebeskind JC (1972) 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, 274: 3603–3605.

8. Akil H, Mayer DJ, Liebeskind JC (1976b) Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. Science, 191: 961–962.

9. Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM (1984) Endogenous opioids: biology and function. Ann Rev Neurosci, 7: 223–255.

10. Akil H, Young E, Walker JM, Watson SJ (1986) The many possible roles of opioids and related peptides in stress-induced analgesia. Ann NY Acad Sci, 467: 140–153.

11. Akinshola BE, Chakrabarti A, Onaivi ES (1999) In-vitro and in vivo action of cannabinoids. Neurochem Res, 24: 1233– 1240.

12. Akirav I, Raizel H, Maroun M (2006) Enhancement of conditioned fear extinction by infusion of the GABA agonist muscimol into the rat prefrontal cortex and amygdala. Eur J Neurosci, 23: 758–764.

13. Al Amin HA, Atweh SF, Jabbur SJ, Saade NE (2004) Effects of ventral hippocampal lesion on thermal and mechanical nociception in neonates and adult rats. Eur J Neurosci, 20: 3027–3034.

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

15. Aloisi AM (1997) Sex differences in pain-induced effects on the septo-hippocampal system. Brain Res, 25: 397–406.

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

17. Amit Z, Galina ZH (1986) Stress-induced analgesia: adaptive pain suppression. Physiol Rev, 66: 1091–1120.

18. Appelbaum BD, Holtzman SG (1985) Restraint stress enhances morphine-induced analgesia in the rat without changing apparent affinity of receptor. Life Sci, 36: 1069–1074.
19. Arjune D, Bodnar RJ (1989) Post-natal morphine differentially affects opiate and stress analgesia in adult rats. Psychopharmacology, 98: 512–517.

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

21. Arreaza G, Devane WA, Omeir RL, Sajnani G, Kunz J, Cravatt BF, Deutsch DG (1997) The cloned rat hydrolytic enzyme responsible for the breakdown of anandamide also catalyzes its formation via the condensation of arachidonic acid and ethanolamine. Neurosci Lett, 234: 59–62.

22. Asensio VJ, Miralles A, Garcia-Sevilla JA (2006) Stimulation of mitogen-activated protein kinase kinases (MEK1/2) by mu-, deltaand kappa-opioid receptor agonists in the rat brain: regulation by chronic morphine and opioid withdrawal. Eur J Pharmacol, 539: 49–56.

23. Bachur NR, Masek K, Melmon KL, Udenfriend S (1965) Fatty acid amides of ethanolamine in mammalian tissues. J Biol Chem, 240: 1019– 1024.

24. Bajic D, Proudfit H (1999) Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine andmedullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. J Comp Neurol, 405: 359–379.

25. Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW, Layward L (2000) Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. Nature, 404: 84–87.

26. Banks WA, Kastin AJ, Ehrensing CA (1993) Endogenous peptide Tyr-Pro-Trp-Gly-NH2 (Tyr-W-MIF-1) is transported from the brain to the blood by peptide transport system-1. J Neurosci Res, 35: 690–5.

27. Banks WA, Kastin AJ, Fischman AJ, Coy DH, Strauss SL (1986) Carrier-mediated transport of enkephalins and N-Tyr-MIF-1 across blood–brain barrier. Am J Physiol, 251: E477–482.

28. Banks WA, Kastin AJ, Harrison LM, Zadina JE (1996) Perinatal treatment of rats with opiates affects the development of the blood–brain barrier transport system PTS-1. Neurotoxicol Teratol, 18: 711–715.

29. Banks WA, Kastin AJ, Michals EA, Barrera CM (1990) Stereospecific transport of Tyr-MIF-1 across the blood–brain barrier by peptide transport system-1. Brain Res Bull, 25: 589–592.

30. Banks WA, Kastin AJ, Michals EA (1987) Tyr-MIF-1 and metenkephalin share a saturable blood–brain barrier transport system. Peptides, 8: 899–903.

31. Banks WA, Kastin AJ (1984) A brain-to-blood carrier-mediated transport system for small, N-tyrosinated peptides. Pharmacol Biochem Behav, 21: 943–946.

32. Banks WA, Kastin AJ (1994) Opposite direction of transport across the blood–brain barrier for Tyr-MIF-1 and MIF-1: comparison with morphine. Peptides, 15: 23–29.

33. Banks WA, Kastin AJ (1985) Peptides and the blood–brain barrier:lipophilicity as a predictor of permeability. Brain Res Bull, 15: 287–292.

34. Banks WA, Kastin AJ (1988) Twenty-one hormones fail to inhibit the brain to blood transport system for Tyr-MIF-1 and the enkephalins in mice. J Pharm Pharmacol, 40: 289–291.

35. Bar-Joseph A, Berkovitch Y, Adamchik J, Biegon A (1994) Neuroprotective activity of HU-211, a novel NMDA antagonist, in global ischemia in gerbils. Mol Chem Neuropathol, 23: 125– 135.

36. Basbaum AI, Fields HL (1979) 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, 187: 513–531.

37. Behbehani MM (1982) 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, 252: 299–307.

38. Behbehani MM, Park MR, Clement ME (1988) Interactions between the lateral hypothalamus and the periaqueductal gray. J Neurosci, 8: 2780–2787.

39. Belayev L, Bar-Joseph A, Adamchik J, Biegon A (1995) HU-211, a nonpsychotropic cannabinoid, improves neurological signs and reduces brain damage after severe forebrain ischemia in rats. Mol Chem Neuropathol, 25: 19– 33.

40. Bell RL, Soignier RD, Olson RD, Vaccarino AL (1998) Reduction of stressinduced analgesia following ethanol exposure in mice. Life Sci, 63: 731–736.

41. Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. Science, 277 : 1094– 1097.

42. Benoist JM, Pincede I, Ballantyne K, Plaghki L, Le Bars D (2008) Peripheral and central determinants of a nociceptive reaction: an approach to psychophysics in the rat. PLoS ONE 3, 3125.

43. Bernatzky G, Doi T, Jurna I (1983) Effects of intrathecally administered pentobarbital and naloxone on the activity evoked in ascending axons of the rat spinal cord by stimulation of afferent A and C fibres. Further evidence for a tonic endorphinergic inhibition in nociception. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 323: 211–216.

44. Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, Di Marzo V (1999) Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. Biochem Biophys Res Commun, 256: 377–380.

45. Blaszczyk JW, Tajchert K, Lapo I, Sadowski B (2000) Acoustic startle and openfield behavior in mice bred for magnitude of swim analgesia. Physiol Behav, 70: 471–476.

46. Blednov YA, Stoffel M, Alva H, Harris RA (2003) A pervasive mechanism for analgesia: activation of GIRK2 channels. Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A., 100: 277–282.

47. Blessing WW (2003) Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. Cell Mol Neurobiol, 23: 527–538.

48. Bocheva A, Dzambazova-Maximova E. (2004) Antiopioid properties of the TYR-MIF-1 family. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 26: 673–677.

49. Bocheva A, Dzambazova-Maximova E (2004) Effects of Tyr-MIF's family of peptides on immobilization stress-induced antinociception in rats. Folia Med (Plovdiv), 46: 42–46.

50. Bodnar RJ (1986) Neuropharmacological and neuroendocrine substrates of stressinduced analgesia. Ann NY Acad Sci, 467: 345–360.

51. Bodnar RJ, Commons KG, Pfaff DW (2002) Gender differences in analgesia. In: Central Neural States Relating Sex and Pain, Johns Hopkins University Press, Baltimore.

52. Bodnar RJ, Glusman M, Brutus M, Spiaggia A, Kelly DD (1979) Analgesia induced by cold-water stress: attenuation following hypophysectomy. Physiol Behav, 23: 53–62.

53. Bodnar RJ, Kelly DD, Spiaggia A, Ehrenberg C, Glusman M (1978a) Dosedependent reductions by naloxone of analgesia induced by cold-water stress. Pharmacol Biochem Behav, 8: 667–672.

54. Bodnar RJ, Kelly DD, Steiner SS, Glusman M (1978b) Stress-produced analgesia andmorphine-produced analgesia: lack of cross-tolerance. Pharmacol Biochem Behav, 8: 661–666.

55. Bodnar RJ, Merrigan KP, Sperber E (1983) Potentiation of cold-water swim analgesia and hypothermia by clonidine. Pharmacol. Biochem. Behav, 19: 447–451.

56. Boger DL, Sato H, Lerner AE, Austin BJ, Patterson JE, Patricelli MF, Cravatt BF (1999) Triflouromethyl ketone inhibitors of fatty acid amide hydrolase: a probe of structural and conformartional features contributing to inhibition. Bioorg Med Chem Lett, 9: 265– 270.

57. Boger DL, Sato H, Lerner AE, Hedrick MP, Fecik RA, Miyauchi H, Wilkie GD, Austin BJ, Patricelli MP, Cravatt BF (2000) Exceptionally potent inhibitors of fatty acid amide hydrolase: the enzyme responsible for degradation of endogenous oleamide and anandamide. Proc Natl Acad Sci USA, 97: 5044– 5049.

58. Bohme GA, Laville M, Ledent C, Parmentier M, Imperato A (2000) Enhanced long-term potentiation in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. Neuroscience, 95: 5–7.

59. Bolles, R.C., Fanselow, M.S., 1980. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. Behav. Brain Sci. 3, 291–301.

60. Bouaboula M, Bianchini L, McKenzie FR, Pouyssegur J, Casellas P (1999a) Cannabinoid receptor CB1 activates the Na+/H + exchanger NHE-1 isoform via Gi-mediated mitogen activated protein kinase signaling transduction pathways. FEBS Lett, 449: 61–65.

61. Bouaboula M, Desnoyer N, Carayon P, Combes T, Casellas P (1999b) Gi protein modulation induced by a selective inverse agonist for the peripheral cannabinoid receptor CB2: implication for intracellular signalization cross-regulation. Mol Pharmacol, 55: 473–480.

62. Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. Biochem J, 312: 637– 641.

63. Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1993) Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. Eur J Biochem, 214 : 173–180.

64. Bouhassira D, Bing Z, Le Bars D (1992a) Effects of lesions of locus coeruleus/ subcoeruleus on diffuse noxious inhibitory controls in the rat. Brain Res, 571: 140–144.

65. Bouhassira D, Bing Z, Le Bars D (1993) Studies of brain structures involved in diffuse noxious inhibitory controls in the rat: the rostral ventromedial medulla. J Physiol, 463: 667–687.

66. Bouhassira D, Chitour D, Villaneuva L, Le Bars D (1995) The spinal transmission of nociceptive information: modulation by the caudal medulla. Neuroscience, 69 : 931–938.

67. Bouhassira D, Villanueva L, Bing Z, Le Bars D (1992c) Involvement of the subnucleus reticularis dorsalis in diffuse noxious inhibitory controls in the rat. Brain Res, 595: 353–357.

68. Bouhassira D, Villanueva L, Le Bars D (1988) Intracerebroventricular morphine decreases descending inhibitions acting on lumbar dorsal horn neuronal activities related to pain in the rat. J Pharmacol Exp Ther, 247: 332–342.

69. Bouhassira D, Villanueva L, Le Bars D (1992b) Effects of systemic morphine on diffuse noxious inhibitory controls: role of the periaqueductal grey. Eur J Pharmacol, 216: 149–156.

70. Bowery NG, Smart TG (2006) GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. Br J Pharmacol, 147 (Suppl. 1): S109–S119.

71. Buchwald A, Browne CE, Wu WM, Ji F, Bodor N (2000) Soft cannabinoid analogues as potential anti-glaucoma agents. Pharmazie, 55: 196–201.

72. Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E (1998) Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. Neuroscience, 82: 1131–1149.

73. Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, Glass M (2000) Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. Eur J Pharmacol, 396: 141– 149.

74. Butler RK, Rea K, Lang Y, Gavin AM, Finn DP (2008) Endocannabinoidmediated enhancement of fear-conditioned analgesia in rats: opioid receptor dependency and molecular correlates. Pain, 140: 491–500.

75. Cabot PJ, Carter L, Gaiddon C, Zhang Q, Schafer M, Loeffler JP, Stein C (1997) Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats. J Clin Invest, 100: 142–148.

76. Cadas H, di Tomaso E, Piomelli D (1997) Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. J Neurosci, 17: 1226–1242.

77. Calcagnetti DJ, Helmstetter FJ, Fanselow MS (1987) Quaternary naltrexone reveals the central mediation of conditional opioid analgesia. Pharmacol. Biochem. Behav, 27: 529–531.

78. Calder AJ, Lawrence AD, Young AW (2001) Neuropsychology of fear and loathing. Nat Rev Neurosci, 2: 352–363.

79. Calignano A, La Rana G, Beltramo M, Makriyannis A, Piomelli D (1997) Potentiation of anandamide hypotension by the transport inhibitor AM404. Eur J Pharmacol, 337: R1– R2.

80. Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D (1998) Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. Nature, 394:277–281.

81. Carlson G, Wang Y, Alger BE (2002) Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. Nature Neuroscience, 5: 723–724.

82. Caulfield MP, Brown, DA (1992) Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. Br J Pharmacol, 106: 231– 232.

83. Cechetto DF, Saper CB (1988) Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. J Comp Neurol, 272: 579–604.

84. Chance WT, Krynock GM, Rosecrans JA (1978) Antinociception following lesioninduced hyperemotionality and conditioned fear. Pain, 4: 243–252.

85. Chen AC, Treede RD, Bromm B (1985) Tonic pain inhibits phasic pain: evoked cerebral potential correlates in man. Psychiatry Res, 14: 343–351.

86. Chesher GB, Chan B (1977) Footshock induced analgesia in mice: its reversal by naloxone and cross tolerance with morphine. Life Sci, 21:1569–1574.

87. Chevaleyre V, Castillo PE (2003) Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. Neuron, 38: 461–472.

88. Chicca A, Marazzi J, Nicolussi S, Gertsch J (2012) Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. J Biol Chem., 287(41): 34660-34682.

89. Chipkin RE, Latranyi MB, Iorio LC (1982) Potentiation of stress-induced analgesia (SIA) by thiorphan and its block by naloxone. Life Sci, 31: 1189–1192.

90. Chiu S, Wong YW, Wan YP, Chiu P, Mishra RK (1983) Are the pharmacological effects of L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (PLG) mediated through specific receptor mechanisms? Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 7: 739–42.

91. Christie MJ, Connor M, Vaughan CW, Ingram SL, Bagley EE (2000) Cellular actions of opioids and other analgesics: implications for synergism in pain relief. Clin Exp Pharmacol Physiol, 27: 520–523.

92. Cichewicz DL, McCarthy EA (2003) Antinociceptive synergy between delta(9)-tetrahydrocannabinol and opioids after oral administration. J Pharmacol Exp Ther, 304: 1010–1015.

93. Colombo G, Agabio R, Diaz G, Lobina C, Reali R, Gessa GL (1998) Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. Life Sci, 63: L113–L117.

94. Connell K, Bolton N, Olsen D, Piomelli D, Hohmann AG (2006) Role of the basolateral nucleus of the amygdala in endocannabinoid-mediated stressinduced analgesia. Neurosci Lett, 397: 180–184.

95. Contet C, Gaveriaux-Ruff C, Matifas A, Caradec C, Champy MF, Kieffer BL (2006) Dissociation of analgesic and hormonal responses to forced swim stress using opioid receptor knockout mice. Neuropsychopharmacology, 31: 1733–1744.

96. Costa A, Smeraldi A, Tassorelli C, Greco R, Nappi G (2005) Effects of acute and chronic restraint stress on nitroglycerin-induced hyperalgesia in rats. Neuroscience letters, 383: 7–11.

97. Coutinho SV, Plotsky PM, Sablad M, Miller JC, Zhou H, Bayati AI, McRoberts JA, Mayer EA (2002) Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol, 282: G307–G316.

98. Cox J, Westbrook RF (1994) The NMDA receptor antagonist MK-801 blocks acquisition and extinction of conditioned hypoalgesic responses in the rat. Q J Exp Psychol, 47: 187–210.

99. Craig KD (2006) Emotions and psychobiology. In: McMahon, S.B. (Ed.), Wall and Melzack's Textbook of Pain. Koltzenburg, M. Elsevier, Philadelphia: 231– 240.

100. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger, DL, Lerner RA, Gilula NB (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. Nature, 384: 83–87.

101. Cruz L, Basbaum AI (1985) Multiple opioid peptides and the modulation of pain: immunohistochemical analysis of dynorphin and enkephalin in the trigeminal nucleus caudalis and spinal cord of the cat. J. Comp. Neurol., 240: 331–348.

102. Cullinan KJ, Hunden GJ, Johnson DC, Chaney DW, Koppel MO, Brownstein M (1998) LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. J Pharmacol Exp Ther, 284: 291– 297.

103. Cunningham PM, Goldsmith GE, Hellon RF (1986) Medial hypothalamic stimulation produces analgesia to facial heating in unrestrained rats. Neurosci. Lett., 68: 107–111.

104. D'Amore A, Loizzo A (1999) Effects of neonatal treatment with Tyr-MIF-1 and naloxone on the long-term body weight gain induced by repeated postnatal stressful stimuli. Peptides, 20: 1425–1430.

105. Dai JL, Zhu YH, Li XY, Huang DK, Xu SF (1992) C-fos expression during electroacupuncture analgesia in rats—an immunohistochemical study. Acupunct. Electro-Therapeutics Res., 17: 165–176.

106. Das DA, Grimmer KA, Sparnon AL, McRae SE, Thomas BH (2005) The efficacy of playing a virtual reality game inmodulating pain for children with acute burn injuries: a randomized controlled trial [ISRCTN87413556]. BMC Pediatrics, 5, 1.

107. De Felipe C, Herrero JF, O'Brien JA, Palmer JA, Doyle CA, Smith AJ, Laird JM, Belmonte C, Cervero F, Hunt SP (1998) Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. Nature, 392: 394–397.

108. Deadwyler SA, Hampson RE, Bennett BA, Edwards TA, Mu J, Pacheco MA, Ward SJ, Childers, SR (1993) Cannabinoids modulate potassium current in cultured hippocampal neurons. Recept Channels, 1: 121–134.

109. deCharms RC, Maeda F, Glover GH, Ludlow D, Pauly JM, Soneji D, Gabrieli JD, Mackey SC (2005) Control over brain activation and pain learned by using real-time functional MRI. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102: 18626–18631.

110. Dennis SG, Choiniere M, Melzack R (1980) Stimulation-produced analgesia in rats: assessment by two pain tests and correlation with self-stimulation. Exp. Neurol., 68: 295–309.

111. Desarnaud F, Cadas H, Piomelli D (1995) Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization. J Biol Chem, 270: 6030– 6035.

112. Deutsch DG, Glaser ST, Howell JM et al. (2001) The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hydrolase. J Biol Chem, 276: 6967–6973.

113. Deutsch, DG., Chin, SA (1993. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. Biochem Pharmacol, 46: 791– 796.

114. Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid P C, Krebsbach RJ, Schmid HH, Das SK, Dey SK, Arreaza G, Thorup, C, Stefano, G, Moore, LC (1997). Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. J Clin Invest 100: 1538– 1546.

115. Devane WA, Axelrod J (1994) Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous ligand for the cannabinoid receptor, by brain membranes. Proc Natl Acad Sci USA, 91: 6698– 6701.

116. Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Mol Pharmacol, 34: 605– 613.

117. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science, 258: 1946–1949.

118. Deyama S, Yamamoto J, Machida T, Tanimoto S, Nakagawa T, Kaneko S, Satoh M, Minami M (2007) Inhibition of glutamatergic transmission by morphine in the basolateral amygdaloid nucleus reduces pain-induced aversion. Neurosci. Res., 59: 199–204.

119. Di Marzo V (1998) ‘‘Endocannabinoids’’ and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. Biochim Biophys Acta, 1392: 153– 175.

120. Di Marzo V, Deutsch DG (1998) Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. Neurobiol Dis, 5: 386–404.

121. Di Marzo V, Bisogno T, Sugiura T, Melck D, De Petrocellis L (1998) The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. Biochem J, 331: 15– 19.

122. Di Marzo V, De Petrocellis L, Sepe N, Buono A (1996) Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. Biochem J, 316: 977–984.

123. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. Nature, 372: 686– 691.

124. Diana MA, Levenes C, Mackie K, Marty A (2002) Short-term retrograde inhibition of GABAergic synaptic currents in rat Purkinje cells is mediated by endogenous cannabinoids, Journal of Neuroscience, 22: 200–208.

125. Dickenson AH, Le Bars D (1987) Supraspinal morphine and descending inhibitions acting on the dorsal horn of the rat. J. Physiol., 384: 81–107.

126. Dickenson AH, Rivot JP, Chaouch A, Besson JM, Le Bars D (1981) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in the rat with or without pCPA pretreatment. Brain Res., 216: 313–321.

127. Dickinson SL, Slater P (1980) Opiate receptor antagonism by Lprolyl-L-leucyl-glycinamide, MIF-I. Peptides, 1: 293–299.

128. Dufton LM, Konik B, Colletti R, Stanger C, Boyer M, Morrow S, Compas BE (2007) Effects of stress on pain threshold and tolerance in children with recurrent abdominal pain. Pain., 8(9): 708-717.

129. Dupont A, Labrie F, Pelletier G, Puviani R, Coy DH, Schally AV (1975) Distribution of radioactivity in the organs of the rat and mouse after injection of L-(3H)prolyl leucylglycin-amide. J Endocrinol, 64: 243–248.

130. Eccleston C, Crombez G (1999) Pain demands attention: a cognitive-affective model of the interruptive function of pain. Psychol. Bull., 125: 356–366.

131. Egertova M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR (1998) A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. Proc Biol Sci, 265: 2081–2085.

132. Ehrensing RH, Kastin AJ, Michell GF (1984) Antagonism of morphine analgesia by prolyl-leucyl-glycinamide (MIF-1) in humans. Pharmacol Biochem Behav, 21: 975–978.

133. Ehrensing RH, Michell GF, Kastin AJ (1982) Similar antagonism of morphine analgesia by MIF-1 and naloxone in Carassius auratus. Pharmacol Biochem Behav, 17: 757–761.

134. Eide PK, Tjølsen A (1988) Effects of serotonin receptor antagonists and agonists on the tail-flick response in mice involve altered tail-skin temperature. Neuropharmacology, 27: 889–893.

135. Emilien G, Beyreuther K, Masters CL, Maloteaux JM (2000) Prospects for pharmacological intervention in Alzheimer disease. Arch Neurol, 57: 454–459.

136. Epps DE, Natarajan V, Schmid PC, Schmid HHO (1979) N-acylethanolamine accumulation in infacted myocardium. Biochem Biophys Commun, 90: 628–633.

137. Erchegyi J, Kastin AJ, Zadina JE (1992) Isolation of a novel tetrapeptide with opiate and antiopiate activity from human brain cortex: Tyr-Pro-Trp-Gly-NH2 (Tyr-W-MIF-1). Peptides, 13: 623–632.

138. Erchegyi J, Zadina JE, Qiu X-D, Kersh DC, Ge L-J, Brown MM (1993) Structure–activity relationship of analogs of the endogenous brain peptides Tyr-MIF-1 and Tyr-W-MIF-1. Pept Res, 6: 31–38.

139. Fabre LF, McLendon D (1981) The efficacy and safety of nabilone (a synthetic cannabinoid) in the treatment of anxiety. J Clin Pharmacol, 21 (suppl.): 377S– 382S.

140. Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A (1995) Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 3376– 3380.

141. Fanselow MS (2000) Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. Behav. Brain Res., 110: 73–81.

142. Fanselow MS, Bolles RC (1979) Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. J. Comp. Physiol. Psychol., 93: 736–744.

143. Fanselow MS, Calcagnetti DJ, Helmstetter FJ (1989) Role ofmu and kappa opioid receptors in conditional fear-induced analgesia: the antagonistic actions of norbinaltorphimine and the cyclic somatostatin octapeptide, Cys2Tyr3Orn5Pen7- amide. J. Pharmacol. Exp. Ther., 250: 825–830.

144. Faris PL, Komisaruk BR, Watkins LR, Mayer DJ (1983) Evidence for the neuropeptide cholecystokinin as an antagonist of opiate analgesia. Science, 219: 310–312.

145. Favaroni Mendes LA, Menescal-de-Oliveira L (2008) Role of cholinergic, opioidergic and GABAergic neurotransmission of the dorsal hippocampus in the modulation of nociception in guinea pigs. Life Sci., 83: 644–650.

146. Feigenbaum JJ, Bergmann F, Richmond SA, Mechoulam R, Nadler Y, Kloog Y, Sokolovsky M (1989) Nonpsychotropic cannabinoid acts as a functional N-methyl-D-aspartate receptor blocker. Proc Natl Acad Sci USA, 86: 9584– 9587.

147. Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA, Felder CC (1993) Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 7656– 7660.

148. Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Glass M, Mackie KP, Fahey AC, Porter CC (2001) Pharmacology & Therapeutics, 90: 45–60

149. Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. Mol Pharmacol, 48: 443–450.

150. Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggin RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW (1996) Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. FEBS Lett, 393: 231–235.

151. Felder CC, Veluz JS, Williams HL, Briley EM, Matsuda LA (1992) Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and non-receptor- mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones. Mol Pharmacol, 42: 838–845.

152. Fernandez-Ruiz J, Berrendero F, Hernandez ML, Ramos JA (2000) The endogenous cannabinoid system and brain development. Trends Neurosci, 23: 14–20.

153. Fields HL, Heinricher MM (1985) Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system. Philos. Trans. R. Soc. Lond., 308: 361–374.

154. Filaretov AA, Bogdanov AI, Iarushkina NI (1995) Stress-induced analgesia. The role of the hormones of the hypophyseal–adrenocortical system. Fiziol Zh Im I M Sechenova, 81: 40–46.

155. Filaretov AA, Bogdanov AI, Yarushkina NI (1996) Stress-induced analgesia. The role of hormones produced by the hypophyseal-adrenocortical system. Neurosci. Behav. Physiol., 26: 572–578.

156. Finn DP, Beckett SR, Richardson D, Kendall DA, Marsden CA, Chapman V (2004) Evidence for differential modulation of conditioned aversion and fearconditioned analgesia by CB1 receptors. Eur. J. Neurosci., 20: 848–852.

157. Finn, D.P., Jhaveri, M.D., Beckett, S.R., Madjd, A., Kendall, D.A., Marsden, C.A., Chapman, V., 2006. Behavioral, central monoaminergic and hypothalamo– pituitary–adrenal axis correlates of fear-conditioned analgesia in rats. Neuroscience 138, 1309–1317.

158. Finn DP, Jhaveri MD, Beckett SR, Roe CH, Kendall DA, Marsden CA, Chapman V (2003) Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. Neuropharmacology, 45: 594–604.

159. Finn DP (2010) Endocannabinoid-mediated modulation of stress responses: Physiological and pathophysiological significance. Immunobiology, 215: 629–646.

160. Fisher A, Mann A, Verma V, Thomas N, Mishra RK, Johnson RL (2006) Design and synthesis of photoaffinity-labeling ligands of the L-prolyl-L-leucylglycinamide binding site involved in the allosteric modulation of the dopamine receptor. J Med Chem, 49: 307–317.

161. Flor H, Birbaumer N, Schulz R, Grusser SM, Mucha RF (2002) Pavlovian conditioning of opioid and nonopioid pain inhibitory mechanisms in humans. Eur. J. Pain, 6: 395–402.

162. Flor H, Grusser SM (1999) Conditioned stress-induced analgesia in humans. Eur. J. Pain, 3: 317–324.

163. Foo H, Helmstetter FJ (2000) Expression of antinociception in response to a signal for shock is blocked after selective downregulation of mu-opioid receptors in the rostral ventromedial medulla. Brain Res. Mol. Brain Res., 76: 282–288.

164. Ford GK, Finn DP (2008) Clinical correlates of stress-induced analgesia: evidence from pharmacological studies. Pain, 140: 3–7.

165. Ford GK, Moriarty O, McGuire BE, Finn DP (2008) Investigating the effects of distracting stimuli on nociceptive behaviour and associated alterations in brain monoamines in rats. Eur. J. Pain., 12(8): 970-979.

166. Fowler-Kerry S, Lander JR (1987) Management of injection pain in children. Pain, 30: 169–175.

167. Fox RJ, Sorenson CA (1994) Bilateral lesions of the amygdala attenuate analgesia induced by diverse environmental challenges. Brain Res., 648: 215–221.

168. Fride E, Mechoulam R (1996) Ontogenetic development of the response to anandamide and delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. Brain Res. Dev. Brain Res., 95: 131–134.

169. Fuchs PN, Balinsky M, Melzack R (1996) Electrical stimulation of the cingulum bundle and surrounding cortical tissue reduces formalin-test pain in the rat. Brain Res., 743: 116–123.

170. Fuchs PN, Melzack R (1996) Restraint reduces formalin-test pain but the effect is not influenced by lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. Exp. Neurol., 139: 299–305.

171. Fukuda T, Nishimoto C, Miyabe M, Toyooka H (2001) The residual effects of hemorrhagic shock on pain reaction and c-fos expression in rats. Anesth. Anal., 93: 424–429.

172. Fukuda T, Nishimoto C, Miyabe M, Toyooka H (2007) Unilateral adrenalectomy attenuates hemorrhagic shock-induced analgesia in rats. J. Anesth., 21: 348–353.

173. Fukunaga H, Takahashi M, Kaneto H, Yoshikawa M (1999) Effects of Tyr-MIF-1 on stress-induced analgesia and the blockade of development of morphine tolerance by stress in mice. Jpn J Pharmacol, 79: 231–235.

174. Fung SC, Fillenz M (1983) The role of pre-synaptic GABA and benzodiazepine receptors in the control of noradrenaline release in rat hippocampus. Neurosci. Lett., 42: 61–66.

175. Galina ZH, Kastin AJ (1988) Differential activity of the endogenous antiopiate Tyr-MIF-1 after various intensities of stress. Neurosci Lett, 84 :312–316.

176. Galina ZH, Kastin AJ (1985) MIF-1 antagonizes warm-, but not cold-water stress-induced analgesia: dissociation from immobility. Peptides, 6: 1109–1112.

177. Galina ZH, Kastin AJ (1987) Tyr-MIF-1 attenuates antinociceptive responses induced by three models of stress-analgesia. Br J Pharmacol, 90: 669–674.

178. Galve-Roperh I, Sanchez C, Cortes ML, del Pulgar TG, Izquierdo M., Guzman M (2000) Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signalregulated kinase activation. Nat Med, 6: 313– 319.

179. Garcia JN, Petersen NP, Nalivaiko E, Blessing WW (2001) Tail artery blood flow measured by chronically implanted Doppler ultrasonic probes in unrestrained conscious rats. J. Neurosci. Methods, 104: 209–213.

180. Garcia-Arraras JE, Murakoshi T, Yanagisawa M, Otsuka M (1986) Descending inhibition of slow spinal reflex in an in vitro preparation of the newborn rat and its possible involvement in pain control. Brain Res., 379: 188–191.

181. Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR (1999) Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca2+ channel current. Am J Physiol, 276: H2085–H2093.

182. Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. Nature Neuroscience , 5: 446–451.

183. Gergen K, Zadina JE, Kastin AJ, Paul D (1996) Intrathecal Tyr-WMIF-1 produces potent, naloxone-reversible analgesia modulated by a2-adrenoceptors. Eur J Pharmacol, 298: 235–239.

184. Gergen KA, Zadina JE, Paul D (1996) Analgesic effects of Tyr-WMIF-1: a mixed mu2-opioid receptor agonist/mu1-opioid receptor antagonist. Eur J Pharmacol, 316: 33–38.

185. Geuze E, Westenberg HG, Jochims A, de Kloet CS, Bohus M, Vermetten E, Schmahl C (2007) Altered pain processing in veterans with posttraumatic stress disorder. Arch. Gen. Psychiatry, 64: 76–85.

186. Ghirardi O, Caprioli A, Ramacci MT, Angelucci L (1994) Effect of long-term acetyl-L-carnitine on stress-induced analgesia in the aging rat. Exp. Gerontol., 29: 569–574.

187. Gifford AN, Bruneus M, Gatley SJ, Lan R, Makriyannis A, Volkow ND (1999a) Large receptor reserve for cannabinoid actions in the central nervous system. J Pharmacol Exp Ther, 288: 478– 483.

188. Gifford AN, Bruneus M, Lin S, Goutopoulos A, Makriyannis A, Volkow ND, Gatley SJ (1999b) Potentiation of the action of anandamide on hippocampal slices by the fatty acid

amide hydrolase inhibitor, palmitylsulphonyl fluoride (AM 374). Eur J Pharmacol, 383: 9 – 14.

189. Gilbert AK, Franklin KB (2002) The role of descending fibers from the rostral ventromedial medulla in opioid analgesia in rats. Eur. J. Pharmacol., 449: 75–84.

190. Girardot MN, Holloway FA (1985) Effect of age and long-term stress experience on adaptation to stress analgesia in mature rats: role of opioids. Behav. Neurosci., 99: 411–422.

191. Girdler SS, Maixner W, Naftel HA, Stewart PW, Moretz RL, Light KC (2005) Cigarette smoking, stress-induced analgesia and pain perception in men and women. Pain, 114: 372–385.

192. Giuffrida A, Piomelli D (1998) Isotope dilution GC/MS determination of anandamide and other fatty acylethanolamides in rat blood plasma. FEBS Lett, 422: 373–376.

193. Giuffrida, A., Parsons, L. H., Kerr, T. M., Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, D., Piomelli, D. (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. Nat Neurosci 2, 358– 563.

194. Giuliani D, Ferrari F, Ottani A (2000) The cannabinoid agonist HU 210 modifies rat behavioural responses to novelty and stress. Pharmacol Res, 41: 47– 53.

195. Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM, Deutsch DG (2003) Evidence against the presence of an anandamide transporter. Proc Natl Acad Sci USA, 100: 4269–4274.

196. Glass M, Dragunow M (1995) Induction of the Krox 24 transcription factor in striosomes by a cannabinoid agonist. Neuroreport, 6: 241–244.

197. Glass M, Felder CC (1997) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. J Neurosci, 17: 5327– 5333.

198. Glass M, Northup JK (1999) Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. Mol Pharmacol, 56: 1362– 1369.

199. Glass M, Dragunow M, Faull RL (1997) Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. Neuroscience, 77: 299– 318.

200. Glass M, Faull RL, Dragunow M (1993) Loss of cannabinoid receptors in the substantia nigra in Huntington's disease. Neuroscience, 56: 523– 527.

201. Glass RM, Uhlenhuth EH, Hartel FW, Schuster CR, Fischman MW (1980) A single dose study of nabilone, a synthetic cannabinoid. Psychopharmacology, 71: 137– 142.

202. Gomez del Pulgar T, Velasco G, Guzman M (2000) The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. Biochem J, 347: 369– 373.

203. Good AJ, Westbrook RF (1995) Effects of a microinjection of morphine into the amygdala on the acquisition and expression of conditioned fear and hypoalgesia in rats. Behav. Neurosci., 109: 631–641.

204. Graf MV, Hunter CA, Kastin AJ (1984) Presence of delta-sleepinducing peptide-like material in human milk. J Clin Endocrinol Metab, 59: 127–132.

205. Grau JW (1987) The central representation of an aversive event maintains the opioid and nonopioid forms of analgesia. Behav. Neurosci., 101: 272–288.

206. Grau JW, Salinas JA, Illich PA, Meagher MW (1990) Associative learning and memory for an antinociceptive response in the spinalized rat. Behav. Neurosci., 104: 489–494.

207. Greenberg R, O'Keefe EH (1982) Thiorphan potentiation of stress-induced analgesia in the mouse. Life Sci., 31: 1185–1188.

208. Griffin G, Tao Q, Abood ME (2000) Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor. J Pharmacol Exp Ther, 292: 886–894.

209. Gui X, Carraway RE, Dobner PR (2004) Endogenous neurotensin facilitates visceral nociception and is required for stress-induced antinociception in mice and rats. Neuroscience, 126: 1023–1032.

210. Guieu R, Serratrice G, Pouget J (1994) Counter irritation test in primary fibromyalgia. Clin. Rheumatol., 13: 605–610.

211. Guimaraes FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW (1990) Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. Psychopharmacology, 100: 558– 559.

212. Gunne LM (1959) Noradrenaline and adrenaline in the rat brain during acute and chronic morphine administration and during withdrawal. Nature, 184 (Suppl. 25): 1950–1951.

213. Gutierrez AC, Keller EA (1997) Analgesic response to stress is reduced in perinatally undernourished rats. J. Nutr., 127: 765–769.

214. Hackler L, Carey ME, Kastin AJ (1995) Enhanced isolation of Tyr-MIF-1 from fresh human brain cortex.. Brain Res Bull, 36: 109–111.

215. Hackler L, Kastin AJ, Erchegyi J, Zadina JE (1993) Isolation of Tyr-W-MIF-1 from bovine hypothalami. Neuropeptides, 24: 159–164.

216. Hackler L, Kastin AJ, Zadina JE 1994 Isolation of a novel peptide with a unique binding profile from human brain cortex: Tyr-K-MIF-1 (Tyr-Pro-Lys-Gly-NH2). Peptides, 15: 945–950.

217. Hamm RJ, Knisely JS (1987) Ontogeny of an endogenous, nonopioid and hormonally mediated analgesic system. Dev. Psychobiol., 20: 539–548.

218. Hamm, R.J., Knisely, J.S., Watson, A., 1986. Environmentally-induced analgesia: agerelated differences in a hormonally-mediated, nonopioid system. J. Gerontol. 41, 336–341.

219. Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998) Cannabidiol and (Δ)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. Proc Natl Acad Sci USA, 95: 8268–8273.

220. Hansen HS, Moesgaard B, Hansen HH, Schousboe A, Petersen G (1999) Formation of N-acyl-phosphatidylethanolamine and N-acylethanolamine (including anandamide) during glutamate-induced neurotoxicity. Lipids, 34 (suppl.): S327– S330.

221. Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98: 3662–3665.

222. Hanus L, Gopher A, Almog S, Mechoulam R (1993) Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. J Med Chem, 36: 3032– 3034.

223. Hardy SG (1985) Analgesia elicited by prefrontal stimulation. Brain Res., 339: 281–284.

224. Harris JA, Westbrook RF (1994) Effects of midazolam and naloxone in rats tested for sensitivity/reactivity to formalin pain in a familiar, novel or aversively conditioned environment. Psychopharmacology, 115: 65–72.

225. Harris JA, Westbrook RF (1995) Effects of benzodiazepine microinjection into the amygdala or periaqueductal gray on the expression of conditioned fear and hypoalgesia in rats. Behav. Neurosci., 109: 295–304.

226. Harris JA, Westbrook RF (1996) Midazolam impairs the acquisition of conditioned analgesia if rats are tested with an acute but not a chronic noxious stimulus. Brain Res. Bull., 39: 227–233.

227. Harris JA, Westbrook RF, Duffield TQ, Bentivoglio M (1995) Fos expression in the spinal cord is suppressed in rats displaying conditioned hypoalgesia. Behav. Neurosci., 109: 320–328.

228. Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE (1998) Tyr-W-MIF-1 attenuates down-regulation of opiate receptors in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. J Pharmacol Exp Ther, 284: 611–617.

229. Harrison LM, Zadina JE, Banks WA, Kastin AJ (1993) Effects of neonatal treatment with Tyr-MIF-1, morphiceptin and morphine on development, tail flick, and blood–brain barrier transport. Dev Brain Res, 75: 207–212.

230. Hart SL, Slusarczyk H, Smith TW (1983) The involvement of opioid deltareceptors in stress induced antinociception in mice. Eur. J. Pharmacol., 95: 283–285.

231. Hatakeyama S, Kawai Y, Ueyama T, Senba E (1996) Nitric oxide synthase-containing magnocellular neurons of the rat hypothalamus synthesize oxytocin and vasopressin and express Fos following stress stimuli. J. Chem. Neuroanat., 11: 243–256.

232. Haulica I, Neamtu C, Stratone A, Petrescu G, Branisteanu D, Rosca V, Slatineanu S (1986) Evidence for the involvement of cerebral rennin–angiotensin system (RAS) in stress analgesia. Pain, 27: 237–245.

233. Hayes RL, Bennett GJ, Newlon PG, Mayer DJ (1978) Behavioral and physiological studies of non-narcotic analgesia in the rat elicited by certain environmental stimuli. Brain Res., 155: 69–90.

234. Hayes RL, Katayama Y (1986) Range of environmental stimuli producing nociceptive suppression: implications for neural mechanisms. Ann. N.Y. Acad. Sci., 467: 1–13.

235. Heinricher MM, Barbaro NM, Fields HL (1989) Putative nociceptivemodulating neurons in the rostral ventromedial medulla of the rat: firing of on- and off-cells is related to nociceptive responsiveness. Somatosens. Motor Res., 6: 427–439.

236. Heinricher MM, Morgan MM, Tortorici V, Fields HL (1994) Disinhibition of offcells and antinociception produced by an opioid action within the rostral ventromedial medulla. Neuroscience 63, 279–288.

237. Helmstetter, F.J., 1992. The amygdala is essential for the expression of conditional hypoalgesia. Behav. Neurosci., 106: 518–528.

238. Helmstetter FJ (1993) Stress-induced hypoalgesia and defensive freezing are attenuated by application of diazepam to the amygdala. Pharmacol. Biochem. Behav., 44: 433–438.

239. Helmstetter FJ, Bellgowan PS, Tershner SA (1993) Inhibition of the tail flick reflex following microinjection of morphine into the amygdala. Neuroreport, 4: 471–474.

240. Helmstetter FJ, Fanselow MS (1987a) Effects of naltrexone on learning and performance of conditional fear-induced freezing and opioid analgesia. Physiol. Behav., 39: 501–505.

241. Helmstetter FJ, Fanselow MS (1987b) Strain differences in reversal of conditional analgesia by opioid antagonists. Behav. Neurosci., 101: 735–737.

242. Helmstetter FJ, Landeira-Fernandez J (1990) Conditional hypoalgesia is attenuated by naltrexone applied to the periaqueductal gray. Brain Res., 537: 88–92.

243. Helmstetter FJ, Tershner SA (1994) Lesions of the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla disrupt antinociceptive but not cardiovascular aversive conditional responses. J. Neurosci., 14: 7099–7108.

244. Hepler RS, Frank IR (1971) Marihuana smoking and intraocular pressure. JAMA, 217, 1392.

245. Hillard C J (2000) Endocannabinoids and vascular function. J Pharmacol Exp Ther, 294: 27– 32.

246. Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahian A, Campbell WB (1997) Accumulation of N-arachidonoylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. J Neurochem, 69: 631– 638.

247. Hillard CJ, Wilkison DM, Edgemond WS, Campbell WB (1995) Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. Biochim Biophys Acta, 1257: 249–256.

248. Ho IK, Loh HH, Way EL (1973) Cyclic adenosine monophosphate antagonism of morphine analgesia. J. Pharmacol. Exp. Ther., 185: 336–346.

249. Ho IK, Loh HH, Way EL (1976) Pharmacological manipulation of gammaaminobutyric acid (GABA) in morphine analgesia, tolerance and physical dependence. Life Sci., 18: 1111–1123.

250. Hobin JA, Ji J, Maren S (2006) Ventral hippocampal muscimol disrupts contextspecific fear memory retrieval after extinction in rats. Hippocampus, 16: 174–182.

251. Hoffman HG, Doctor JN, Patterson DR, Carrougher GJ, Furness 3rd TA (2000) Virtual reality as an adjunctive pain control during burn wound care in adolescent patients. Pain, 85: 305–309.

252. Hoffman HG, Garcia-Palacios A, Patterson DR, Jensen M, Furness 3rd T, Ammons Jr WF (2001) The effectiveness of virtual reality for dental pain control: a case study. Cyberpsychol. Behav., 4: 527–535.

253. Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, Krey JF, Walker JM, Holmes PV, Crystal JD, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D (2005) An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. Nature, 435: 1108–1112.

254. Holland M, John Challiss RA, Standen NB, Boyle JP (1999) Cannabinoid CB1 receptors fail to cause relaxation, but couple via Gi/ Go to the inhibition of adenylyl cyclase in carotid artery smooth muscle. Br J Pharmacol, 128: 597– 604.

255. Horvath A, Kastin AJ (1990) Evidence for presence of Tyr-MIF-1(Tyr-Pro-Leu-Gly-NH2) in human brain cortex. Int J Peptide Protein Res, 36: 281–284.

256. Horvath A, Kastin AJ (1989) Isolation of tyrosine-melanocytestimulating hormone release-inhibiting factor 1 from bovine brain tissue. J Biol Chem, 264: 2175–2179.

257. Houle M, McGrath PA, Moran G, Garrett OJ (1988) The efficacy of hypnosis- and relaxation-induced analgesia on two dimensions of pain for cold pressor and electrical tooth pulp stimulation. Pain, 33: 241–251.

258. Houston AJ, Wong JC, Ebenezer IS (1997) A study on the involvement of GABAB receptor ligands in stress-induced antinociception in male mice. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., 19: 167–171.

259. Howlett A (1984) Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradiol compounds. Life Sci, 35: 1803– 1810.

260. Howlett A, Fleming R (1984) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response of neuroblastoma cell membranes. Mol Pharmacol, 26: 532– 538.

261. Howlett A, Qualy J, Khachatrain L (1986) Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabinoid drugs. Mol Pharmacol, 29: 307– 313.

262. Hua S, Hermanussen S, Tang L, Monteith GR, Cabot PJ (2006) The neural cell adhesion molecule antibody blocks cold water swim stress-induced analgesia and cell adhesion between lymphocytes and cultured dorsal root ganglion neurons. Anesth. Anal., 103: 1558–1564.

263. Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99: 8400–8405.

264. Hugues S, Deschaux O, Garcia R (2004) Postextinction infusion of a mitogenactivated protein kinase inhibitor into the medial prefrontal cortex impairs memory of the extinction of conditioned fear. Learn Mem., 11: 540–543.

265. Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunos G (1996) Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. Br. J. Pharmacol., 118: 2023–2028.

266. Jaggar SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS (1998) The antihyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. Pain, 76: 189–199.

267. Janssen SA, Arntz A (1996) Anxiety and pain: attentional and endorphinergic influences. Pain, 66: 145–150.

268. Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BM, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A, Kunos G (1999) Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 14136–14141.

269. Jennings EA, Vaughan CW, Christie MJ (2001) Cannabinoid actions on rat superficial medullary dorsal horn neurons in vitro. J. Physiol., 534: 805–812.

270. Jia H, Xie YF, Xiao DQ, Tang JS (2004) Involvement of GABAergic modulation of the nucleus submedius (Sm) morphine-induced antinociception. Pain, 108: 28–35.

271. Johnson DE, Heald SL, Dally RD, Janis RA (1993) Isolation, identification and synthesis of an endogenous arachidonic amide that inhibits calcium channel antagonist 1,4-dihydropyridine binding. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 48: 429– 437.

272. Johnson MR, Rice KC, Howlett A, Melvin LS, Herkenham M (1992) The cannabinoid receptor-pharmacologic identification, anatomical localization and cloning. NIDA Res Monogr, 119: 86– 90.

273. Juan H (1981) Dependence of histamine-evoked nociception on prostaglandin release. Agents Actions, 11: 706–710.

274. Kaczocha M, Hermann A, Glaser ST, Bojesen IN, Deutsch DG (2006) Anandamide uptake is consistent with rate-limited diffusion and is regulated by the degree of its hydrolysis by fatty acid amide hydrolase. J Biol Chem, 281: 9066–9075.

275. Kastin AJ, Dickson JC (1987) Hypophysectomy increases Tyr-MIF-1-like immunoreactivity in rat plasma.Neuroendocrinology, 45: 177–181.

276. Kastin AJ, Fabre L, Banks WA, Hackler L, Zadina JE (1995) Increase in plasma Tyr-MIF-1-like immunoreactivity after hypophysectomy is robust and reversible by corticosterone. Neuropeptides, 28: 65–71.

277. Kastin AJ, Fabre L, Banks WA, Zadina JE (1993) Uptake, content, regulation of plasma concentration, and binding of Tyr-MIF-1 by the adrenals. Neuroendocrinology, 57: 5419.

278. Kastin AJ, Fabre L, Brown MM, Olson RD (1992) Age-and sexrelated changes in Tyr-MIF-1-like immunoreactivity in rat plasma. Neuroendocrinology, 56: 902–906.

279. Kastin AJ, Fasold MB, Zadina JE (2002) Endomorphins, Met-Enkephalin, Tyr-MIF-1, and the P-glycoprotein efflux system. Drug Metab Disp, 30: 231–234.

280. Kastin AJ, Giles TD, Dickson JC (1986) Immunoreactive plasma concentrations of an endogenous antiopiate are higher in spontaneously hypertensive rats than in Wistar-Kyoto rats. Hypertension, 8: 198–202.

281. Kastin AJ, Hahn K, Banks WA, Zadina JE (1998) Regional differences in the metabolism of Tyr-MIF-1 and Tyr-WMIF-1 by rat brain mitochondria. Biochem Pharmacol, 55: 33–36.

282. Kastin AJ, Hahn K, Erchegyi J, Zadina JE, Hackler L, Palmgren M (1994) Differential metabolism of Tyr-MIF-1 and MIF-1 in rat and human plasma. Biochem Pharmacol, 47: 699–709.

283. Kastin AJ, Hahn K, Zadina JE, Banks WA, Hackler L (1995) Melanocyte-stimulating hormone release-inhibiting factor-1 (MIF-1) can be formed from Tyr-MIF-1 in brain mitochondria but not in brain homogenate. J Neurochem, 64: 1855–1859.

284. Kastin AJ, Lawrence SP, Coy DH (1981) Radioimmunoassayable N-Tyr-MIF-1-like activity in the rat brain is increased by pinealectomy. Brain Res Bull, 7: 697–702.

285. Kastin AJ, Nissen C, Zadina JE, Schally AV, Ehrensing RH (1980) Naloxone-like actions of MIF-1 do not require the presence of the pituitary. Pharmacol Biochem Behav, 13: 907–912.

286. Kastin AJ, Olson RD, Ehrensing RH, Berzas MC, Schally AV, Coy DH (1979) MIF-1's differential actions as an opiate antagonist. Pharmacol Biochem Behav, 11: 721–723.

287. Kastin AJ, Schwartzenburg D, Tsui L, Miller LG, Olson GA, Olson RD (1989) Differential effects of Tyr-MIF-1 and naloxone in two animal models involving benzodiazepine. Brain Res Bull, 23: 443–446.

288. Kastin AJ, Stephens E, Ehrensing RH, Fischman AJ (1984) Tyr-MIF-1 acts as an opiate antagonist in the tail-flick test. Pharmacol Biochem Behav, 21: 937–941.

289. Kastin AJ, Stephens E, Zadina JE, Coy DH, Fischman AJ (1985) Tyr-MIF-1, identified in brain tissue, and its analogs are active in two models of antinociception. Pharmacol Biochem Behav, 23: 1045–1049.

290. Katayama K, Ueda N, Katoh I, Yamamoto S (1999) Equilibrium in the hydrolysis and synthesis of cannabimimetic anandamide demonstrated by a purified enzyme. Biochim Biophys Acta, 1440: 205–214.

291. Kathmann M, Bauer U, Schlicker E, Gothert M (1999) Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 359: 466– 470.

292. Katona I, Rancz EA, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund TF (2001) Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. J. Neurosci., 21: 9506–9518.

293. Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. J. Neurosci., 19: 4544–4558.

294. Kavaliers M, Hirst M (1986) Inhibitory influences of FMRFamide and PLG on stress-induced opioid analgesia and activity. Brain Res, 372: 370–374.

295. Kavaliers M, Hirst M (1986) Inhibitory influences of MIF-1 (PLG) and Tyr-MIF-1 (YPLG) on aggression and defeat-induced analgesia in mice. Peptides, 7: 1007–1010.

296. Kavaliers M, Hirst M (1986) Prolyl-leucyl-glycinamide (PLG): inhibition of offensive aggression in mice. Life Sci, 39: 1729–1735.

297. Kavaliers M, Innes DGL (1993) Sex differences in naloxone- and Tyr-MIF-1-induced hypoalgesia. Peptides, 14: 1001–1004.

298. Kavaliers M, Innes DGL (1992) Sex differences in the effects of Tyr-MIF-1 on morphine- and stress-induced analgesia. Peptides, 13: 1295–1297.

299. Kavaliers M (1987) MIF-1 and Tyr-MIF-1 antagonize morphine and opioid but not non-opioid stress-induced analgesia in the snail, Cepaea nemoralis. Peptides, 8: 1–5.

300. Kavaliers M (1988) Brief exposure to a natural predator, the short-tailed weasel, induces benzodiazepine-sensitive analgesia in white-footed mice. Physiol Behav, 43: 187–193.

301. Kavaliers M, Choleris E, Colwell DD (2001) Learning from others to cope with biting flies: social learning of fear-induced conditioned analgesia and active avoidance. Behav Neurosci, 115: 661–674.

302. Kavaliers M, Colwell DD, Choleris E (1998) Sex differences in opioid and Nmethyl- D-aspartate mediated non-opioid biting fly exposure induced analgesia in deer mice. Pain, 77: 163–171.

303. Kavaliers M, Colwell DD, Perrot-Sinal TS (1997) Opioid and non-opioid NMDAmediated predator-induced analgesia in mice and the effects of parasitic infection. Brain Res, 766: 11–18.

304. Kavaliers M, Ossenkopp KP (1988) Day–night rhythms of opioid and non-opioid stress-induced analgesia: differential inhibitory effects of exposure to magnetic fields. Pain, 32: 223-229.

305. Kawarada K, Kamata K, Matsumoto N (1996) Effect of electrical stimulation of the central amygdaloid nucleus on the nociceptive neuron of the cortex (SI) in the cat. Jpn. J. Physiol., 46: 485–490.

306. Kelsey JE, Baker MD (1983) Ventromedial septal lesions in rats reduce the effects of inescapable shock on escape performance and analgesia. Behav. Neurosci., 97: 945–961.

307. Kelsey JE, Hoerman WA, Kimball 3rd LD, Radack LS, Carter MV (1986) Arcuate nucleus lesions reduce opioid stress-induced analgesia (SIA) and enhance non-opioid SIA in rats. Brain Res., 382: 278–290.

308. Kempe K, Hsu FF, Bohrer A, Turk J (1996) Isotope dilution mass spectrometric measurements indicate that arachidonylethanolamide, the proposed endogenous ligand of the cannabinoid receptor, accumulates in rat brain tissue post mortem but is contained at low levels in or is absent from fresh tissue. J Biol Chem, 271: 17287– 17295.

309. Kent JM (2000) SNaRIs, NaSSAs, and NaRIs: new agents for the treatment of depression. Lancet, 355: 911 –918.

310. Kest B, Jenab S, Brodsky M, Sadowski B, Belknap JK, Mogil JS, Inturrisi CE (1999) Mu and delta opioid receptor analgesia, binding density, andmRNA levels in mice selectively bred for high and low analgesia. Brain Res., 816: 381–389.

311. Khalil Z, Sanderson K, Modig M, Nyberg F (1999) Modulation of peripheral inflammation by locally administered endomorphin-1. Inflamm Res, 48: 550–556.

312. Kieffer BL (1999) Opioids: first lessons from knockoutmice. Trends Pharmacol. Sci., 20: 19–26.

313. Killian P, Holmes BB, Takemori AE, Portoghese PS, Fujimoto JM (1995) Cold water swim stress- and delta-2 opioid-induced analgesia are modulated by spinal gamma-aminobutyric acidA receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther., 274: 730–734.

314. Kim JJ, Clark RE, Thompson RF (1995) Hippocampectomy impairs the memory of recently, but not remotely, acquired trace eyeblink conditioned responses. Behav. Neurosci., 109: 195–203.

315. Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. Science, 256: 675–677.

316. King M, Su W, Chang A, Zukerman A, Pasternak GW (2001) Transport of opioids from the brain to the periphery by Pglycoprotein: peripheral actions of central drugs. Nat Neurosci, 4: 268–274.

317. Kinscheck IB, Watkins LR, Mayer DJ (1984) Fear is not critical to classically conditioned analgesia: the effects of periaqueductal gray lesions and administration of chlordiazepoxide. Brain Res., 298: 33–44.

318. Kinsley CH, Mann PE, Bridges RS (1988) Prenatal stress alters morphine- and stress-induced analgesia in male and female rats. Pharmacol. Biochem. Behav, 30: 123–128.

319. Koga D, Santa T, Fukushima T, Homma H, Imai K (1997) Liquid chromatographic–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric determination of anandamide and its analogs in rat brain and peripheral tissues. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 690: 7 – 13.

320. Komisaruk BR, Wallman J (1977) Antinociceptive effects of vaginal stimulation in rats: neurophysiological and behavioral studies. Brain Res., 137: 85–107.

321. Konarzewski M, Sadowski B, Jozwik I (1997) Metabolic correlates of selection for swim stress-induced analgesia in laboratory mice. Am. J. Physiol., 273: R337–R343.

322. Krause W, Nieber K, Ehrlich A, Bienert M, Oehme P (1984) Naloxone-like protective effect of MIF-1 (Pro-Leu-Gly-NH2) on hemorrhagic shock. Pharmazie, 39: 352–353.

323. Kreitzer AC, Regehr WG (2001a) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. Neuron, 29: 717–727.

324. Kreitzer AC, Regehr WG (2001b) Cerebeller depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. Journal of Neuroscience, 21: RC174.

325. Kreitzer AC, Regehr WG (2002) Retrograde signaling by endocannabinoids. Current Opinion in Neurobiology, 12: 324–330.

326. Kuehl FA, Jacob TA Jr, Ganley OH., Ormond RE., Meisinger MAP (1957) The identification of an anti-inflammatory agent present in egg yolk, soybean lecithin and peanut oil. J Am Chem Soc, 79: 5577– 5578.

327. Kulling P, Frischknecht HR, Pasi A,Waser PG, Siegfried B (1988) Social conflictinduced changes in nociception and beta-endorphin-like immunoreactivity in pituitary and discrete brain areas of C57BL/6 and DBA/2 mice. Brain Res., 450: 237–246.

328. Kulling P, Siegfried B, Frischknecht HR, Messiha FS, Pasi A (1989) Betaendorphin-like immunoreactivity levels in the hypothalamus, the periaqueductal grey and the pituitary of the DBA mouse: determination by ELISA and relationship to nociception. Physiol. Behav., 46:25–28.

329. Kurahashi Y, Ueda N, Suzuki H, Suzuki M, Yamamoto S (1997) Reversible hydrolysis and synthesis of anandamide demonstrated by recombinant rat fatty-acid amide hydrolase. Biochem Biophys Res Commun, 237: 512–515.

330. Kurrikoff K, Inno J, Matsui T, Vasar E (2008) Stress-induced analgesia in mice: evidence for interaction between endocannabinoids and cholecystokinin. Eur. J. Neurosci., 27: 2147–2155.

331. Kurumaji A, Takashima M, Shibuya H (1987) Cold and immobilization stressinduced changes in pain responsiveness and brain Met-enkephalin-like immunoreactivity in the rat. Peptides, 8: 355–359.

332. Lambert DM, Di Marzo V (1999) The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic? Curr Med Chem, 6: 757– 773.

333. Landsman R S, Burkey TH, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI (1997) SR141716A is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. Eur J Pharmacol, 334: R1– R2.

334. Landsman RS, Makriyannis A, Deng H, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI (1998) AM630 is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. Life Sci, 62: L109–L113.

335. Lapo IB, Konarzewski M, Sadowski B (2003a) Analgesia induced by swim stress: interaction between analgesic and thermoregulatory mechanisms. Pflugers. Arch., 446: 463–469.

336. Lapo IB, Konarzewski M, Sadowski B (2003b) Differential metabolic capacity of mice selected for magnitude of swim stress-induced analgesia. J. Appl. Physiol., 94: 677–684.

337. Lapo IB, Konarzewski M, Sadowski B (2003c) Effect of cold acclimation and repeated swimming on opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia in selectively bred mice. Physiol. Behav., 78: 345–350.

338. Lautenbacher S, Rollman GB (1997) Possible deficiencies of pain modulation in fibromyalgia. Clin. J. Pain, 13: 189–196.

339. Lazareno S, Popham A, Birdsall NJ (2000) Allosteric interactions of staurosporine and other indolocarbazoles with N-[methyl-(3)H]scopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: identification of a second allosteric site. Mol Pharmacol, 58: 194–207.

340. Le Bars D, Bourgoin S, Clot AM, Hamon M, Cesselin F (1987) Noxious mechanical stimuli increase the release of Met-enkephalin-like material heterosegmentally in the rat spinal cord. Brain Res., 402: 188–192.

341. Le Bars D, Guilbaud G, Chitour D, Besson JM (1980) Does systemic morphine increase descending inhibitory controls of dorsal horn neurones involved in nociception? Brain Res., 202 : 223–228.

342. Le Bars D, Villanueva L, Bouhassira D, Willer JC (1992) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in animals and in man. Patol. Fiziol. Eksp. Ter., 55–65.

343. Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. Science, 283: 401– 404.

344. Lee C, Rodgers RJ (1990) Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. Psychopharmacology, 102: 507–513.

345. Lee HJ, Choi JS, Brown TH, Kim JJ (2001) Amygdalar nmda receptors are critical for the expression of multiple conditioned fear responses. J. Neurosci., 21: 4116–4124.

346. Lehmann H, Lacanilao S, Sutherland RJ (2007) Complete or partial hippocampal damage produces equivalent retrograde amnesia for remote contextual fear memories. Eur. J. Neurosci., 25: 1278–1286.

347. Lemberger L (1999) Nabilone: a synthetic cannabinoid of medicinal value. In G. G. Nahas, K. M. Sutin, D. J. Harvey, & S. Agurell (Eds.), Marihuana and Medicine: 561– 566.

348. Lewis IH, Campbell DN, Barrowcliffe MP (1994) Effect of nabilone on nausea and vomiting after total abdominal hysterectomy. Br J Anaesth, 73: 244–246.

349. Lewis JW, Baldrighi G, Akil H (1987) A possible interface between autonomic function and pain control: opioid analgesia and the nucleus tractus solitarius. Brain Res., 424: 65–70.

350. Lewis JW, Cannon JT, Chudler EH, Liebeskind JC (1981) Effects of naloxone and hypophysectomy on electroconvulsive shock-induced analgesia. Brain Res., 208: 230–233.

351. Lewis JW, Cannon JT, Liebeskind JC (1980) Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia. Science, 208: 623–625.

352. Libet B (1982) Brain stimulation in the study of neuronal functions for conscious sensory experiences. Hum. Neurobiol., 1: 235–242.

353. Lichtman AH, Cook SA, Martin BR (1996) Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement. J. Pharmacol. Exp. Ther., 276: 585–593.

354. Lico MC, Hoffmann A, Covian MR (1974) Influence of some limbic structures upon somatic and autonomic manifestations of pain. Physiol. Behav., 12: 805–811.

355. Liebeskind JC, Mayer DJ (1971) Somatosensory evoked responses in the mesencephalic central gray matter of the rat. Brain Res., 27: 133–151.

356. Link R, Daunt D, Barsh G, Chruscinski A, Kobilka B (1992) Cloning of two mouse genes encoding alpha 2-adrenergic receptor subtypes and identification of a single amino acid in the mouse alpha 2-C10 homolog responsible for an interspecies variation in antagonist binding. Mol Pharmacol, 42: 16– 27.

357. Lipa SM, Kavaliers M, Ossenkopp KP (1989) Differential inhibitory effects of MIF-1, Tyr-MIF-1, naloxone and bfunaltrexamine on body rotation-induced analgesia in the meadow vole, Microtus pennsylvanicus. Peptides, 10: 493–497.

358. Little PJ, Compton DR, Johnson MR, Melvin LS, Martin BR (1988) Pharmacology and stereoselectivity of structurally novel cannabinoids in mice. J Pharmacol Exp Ther, 247: 1046–1051.

359. Liu J, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makiryannis A, Kunos G (2000) Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. Biochem J, 346: 835– 840.

360. Lopez R, Young SL, Cox VC (1991) Analgesia for formalin-induced pain by lateral hypothalamic stimulation. Brain Res., 563 : 1–6.

361. Lu F, Tang J, Yuan B, Jia H (1996) Effects of bilateral lesions of ventrolateral orbital cortex on the rat tail flick reflex inhibition evoked by electroacupuncture. 21: 39–42.

362. Luciano MG, Zadina JE, Kastin AJ, Coy DH (1981) Mu and delta opiate receptors in rat brain are affected by GTP but not by MIF-1. Brain Res Bull, 7: 677–682.

363. Lutfy K, Sadowski B, Marek P, Kwon IS, Keana JF, Weber E (1996) Differential sensitivity of mice bred for stress-induced analgesia to morphine and ACEA- 1011 in the formalin test. Pharmacol. Biochem. Behav., 54: 495–500.

364. Lynn AB, Herkenham M (1994) Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. J Pharmacol Exp Ther, 268: 1612–1623.

365. Mackie K, Hille B (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. Proc Natl Acad Sci USA, 89: 3825– 3829.

366. Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R (1995) Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. J Neurosci, 15: 6552– 6561.

367. MacLennan AJ, Drugan RC, Hyson RL, Maier SF, Madden 4th J, Barchas JD (1982b) Corticosterone: a critical factor in an opioid form of stress-induced analgesia. Science, 215: 1530–1532.

368. MacLennan AJ, Drugan RC, Hyson RL, Maier SF, Madden Jt, Barchas JD (1982a) Dissociation of long-term analgesia and the shuttle box escape deficit caused by inescapable shock. J. Comp. Physiol. Psychol., 96: 904–912.

369. Madden Jt, Akil H, Patrick RL, Barchas JD (1977) Stress-induced parallel changes in central opioid levels and pain responsiveness in the rat. Nature, 265: 358–360.

370. Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992) Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons. Neurosci Lett, 148: 173–176.

371. Malin DR, Zadina JE, Lake JR, Rogillio RB, Benson TM, Corriere LS (1993) Tyr-MIF-1 precipitates abstinence syndrome in morphine-dependent rats. Brain Res, 610: 169–171.

372. Mantegazza P, Tammiso R, Vicentini L, Zambotti F, Zonta N (1979) Muscimol antagonism of morphine analgesia in rats. Br. J. Pharmacol., 67: 103–107.

373. Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernandez-Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA (1999) Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. Trends Pharmacol Sci, 20: 287– 294.

374. Mao J, Price DD, Lu J, Keniston L, Mayer DJ (2000) Two distinctive antinociceptive systems in rats with pathological pain. Neurosci Lett, 280: 13– 16.

375. Marchand S, Bushnell MC, Duncan GH (1991) Modulation of heat pain perception by high frequency transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). The Clinical journal of pain, 7: 122–129.

376. Marek P, Mogil JS, Belknap JK, Sadowski B, Liebeskind JC (1993) Levorphanol and swim stress-induced analgesia in selectively bred mice: evidence for genetic commonalities. Brain Res., 608: 353–357.

377. Marek P, Panocka I, Hartmann G (1982) Enhancement of stress-induced analgesia in adrenalectomized mice: its reveral by dexamethasone. Pharmacol. Biochem. Behav., 15: 403–405.

378. Maren S (2001) Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. Ann. Rev. Neurosci., 24: 897–931.

379. Maren S, Holt W (2000) The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. Behav. Brain Res., 110: 97–108.

380. Maresh GA, Kastin AJ, Brown TT, Zadina JE, Banks WA (1999) Peptide transport system 1 (PTS-1) for Tyr-MIF-1 and Met-enkephalin differs from the receptors for either. Brain Res, 839: 336–340.

381. Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. Nature, 418: 530–534.

382. Martin BR, Lichtman AH (1998) Cannabinoid transmission and pain perception. Neurobiol Dis, 5: 447–461.

383. Martin WJ, Loo CM, Basbaum AI (1999) Spinal cannabinoids are anti-allodynic in rats with persistent inflammation. Pain, 82: 199–205.

384. Mascia MS, Obinu MC, Ledent C, Parmentier M, Bohme GA, Imperato A, Fratta W (1999) Lack of morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens of cannabinoid CB(1) receptor knockout mice. Eur J Pharmacol, 383: R1– R2.

385. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature, 346: 561–564.

386. Matus-Amat P, Higgins EA, Barrientos RM, Rudy JW (2004) The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. J. Neurosci., 24: 2431–2439.

387. Maurelli S, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Luccia A, Marino G, Di Marzo V (1995) Two novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma ‘‘anandamide amidohydrolase’’. FEBS Lett, 377: 82–86.

388. Mayer DJ, Liebeskind JC (1974) Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an anatomical and behavioral analysis. Brain Res., 68: 73–93.

389. Mayer DJ, Price DD (1976) Central nervous system mechanisms of analgesia. Pain, 2: 379–404.

390. Mayer DJ, Wolfle TL, Akil H, Carder B, Liebeskind JC (1971) Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. Science, 174: 1351–1354.

391. McEwen BS (2001) Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. Ann. N.Y. Acad. Sci., 933: 265–277.

392. McFarland MJ, Porter AC, Rakhshan FR, Rawat DS, Gibbs RA, Barker EL (2004) A role for caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide. J Biol Chem, 279: 41991–41997.

393. McNally GP, Akil H (2001) Effects of contextual or olfactory cues previously paired with morphine withdrawal on behavior and pain sensitivity in the rat. Psychopharmacology, 156: 381–387.

394. McNally GP, Johnston IN, Westbrook RF (2000) A peripheral, intracerebral, or intrathecal administration of an opioid receptor antagonist blocks illnessinduced hyperalgesia in the rat. Behav. Neurosci., 114: 1183–1190.

395. Meagher MW, Arnau RC, Rhudy JL (2001) Pain and emotion: effects of affective picture modulation. Psychosom. Med., 63: 79–90.

396. Meagher MW, Chen PS, Salinas JA, Grau JW (1993) Activation of the opioid and nonopioid hypoalgesic systems at the level of the brainstem and spinal cord: does a coulometric relation predict the emergence or form of environmentally induced hypoalgesia? Behav. Neurosci., 107: 493–505.

397. Meagher MW, Grau JW, King RA (1989) Frontal cortex lesions block the opioid and nonopioid hypoalgesia elicited by brief shocks but not the nonopioid hypoalgesia elicited by long shocks. Behav. Neurosci., 103: 1366–1371.

398. Meagher MW, Grau JW, King RA (1990) Role of supraspinal systems in environmentally induced antinociception: effect of spinalization and decerebration on brief shock-induced and long shock-induced antinociception. Behav. Neurosci., 104: 328–338.

399. Mechoulam R (1999) Recent advantages in cannabinoid research. Forsch Komplementarmed, 6 (3): 16–20.

400. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RF, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. Biochem Pharmacol, 50: 83–90.

401. Mechoulam R, Gaoni Y (1965) A total synthesis of Dl-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. J. Am. Chem. Soc., 87: 3273–3275.

402. Meeus M, Nijs J, Van deWauwer N, Toeback L, Truijen S (2008) Diffuse noxious inhibitory control is delayed in chronic fatigue syndrome: an experimental study. Pain, 139: 439–448.

403. Melvin L., Johnson MR (1987) Structure– activity relationships of tricyclic and nonclassical bicyclic cannabinoids. NIDA Res Monogr, 79: 31– 47.

404. Melzack R, Jeans ME, Stratford JG, Monks RC (1980) Ice massage and transcutaneous electrical stimulation: comparison of treatment for low-back pain. Pain, 9: 209–217.

405. Melzack R, Wall PD (1962) On the nature of cutaneous sensory mechanisms. Brain, 85: 331–356.

406. Melzack R, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. Science, 150: 971–979.

407. Mena NB, Mathur R, Nayar U (1995) Amygdalar involvement in pain. Indian J. Physiol. Pharmacol., 39: 339–346.

408. Menendez L, Andres-Trelles F, Hidalgo A, Baamonde A (1993) Involvement of spinal kappa opioid receptors in a type of footshock induced analgesia in mice. Brain Res., 611: 264–271.

409. Meng ID, Manning BH, Martin WJ, Fields HL (1998) An analgesia circuit activated by cannabinoids. Nature, 395: 381–383.

410. Millan MJ (2002) Descending control of pain. Prog. Neurobiol, 66: 355–474.

411. Millan MJ (2003) The neurobiology and control of anxious states. Prog. Neurobiol, 70: 83–244.

412. Millan MJ, Gramsch C, Przewlocki R, Herz A (1980) Lesions of the hypothalamic arcuate nucleus produce a temporary hyperalgesia and attenuate stress-evoked analgesia. Life Sci, 27: 1513–1523.

413. Millan MJ, Przewlocki R, Herz A (1980) A non-beta-endorphinergic adenohypophyseal mechanism is essential for an analgetic response to stress. Pain, 8: 343–353.

414. Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. Prog. Neurobiol., 57: 1–164.

415. Miller DB (1988) Restraint-induced analgesia in the CD-1 mouse: interactions with morphine and time of day. Brain Res., 473: 327–335.

416. Mogil JS, Flodman P, Spence MA, Sternberg WF, Kest B, Sadowski B, Liebeskind JC, Belknap JK (1995) Oligogenic determination of morphine analgesic magnitude: a genetic analysis of selectively bred mouse lines. Behav. Genet., 25: 397–406.

417. Mogil JS, Marek P, Flodman P, Spence MA, Sternberg WF, Kest B, Sadowski B, Liebeskind JC (1995) One or two genetic loci mediate high opiate analgesia in selectively bred mice. Pain, 60: 125–135.

418. Mogil JS, Marek P, O'Toole LA, Helms ML, Sadowski B, Liebeskind JC, Belknap JK (1994) Mu-opiate receptor binding is up-regulated in mice selectively bred for high stress-induced analgesia. Brain Res., 653: 16–22.

419. Mogil JS, Sternberg WF, Balian H, Liebeskind JC, Sadowski B (1996) Opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia: a parametric analysis in mice. Physiol. Behav., 59: 123–132.

420. Mogil JS, Sternberg WF, Marek P, Sadowski B, Belknap JK, Liebeskind JC (1996) The genetics of pain and pain inhibition. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93: 3048–3055.

421. Moreau JL, Fields HL (1986) Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission. Brain Res, 397: 37–46.

422. Mousa S, Miller Jr, CH, Couri D (1981) Corticosteroid modulation and stressinduced analgesia in rats. Neuroendocrinology, 33: 317–319.

423. Mousa S, Miller Jr CH, Couri D (1983) Dexamethasone and stress-induced analgesia. Psychopharmacology, 79: 199–202.

424. Mu J, Zhuang S Y, Kirby MT, Hampson RE, Deadwyler SA (1999) Cannabinoid receptors differentially modulate potassium A and D currents in hippocampal neurons in culture. J Pharmacol Exp Ther, 291: 893– 902.

425. Muller-Vahl KR, Kolbe H, Schneider U, Emrich HM (1998) Cannabinoids: possible role in patho-physiology and therapy of Gilles de la Tourette syndrome. Acta Psychiatr Scand, 98: 502– 506.

426. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature, 365: 61–65.

427. Nadler V, Mechoulam R, Sokolovsky M (1993) The non-psychotropic cannabinoid (+)-(3S,4S)-7-hydroxy-delta 6-tetrahydrocannabinol 1,1-dimethylheptyl (HU-211) attenuates N-methyl-D-aspartate receptormediated neurotoxicity in primary cultures of rat forebrain. Neurosci Lett, 162: 43–45.

428. Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, Greenberg DA (1999) Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. J Neurosci, 19: 2987– 2995.

429. Nair RMG, Kastin AJ, Schally AV (1971) Isolation and structure of hypothalamic MSH release-inhibiting hormone. Biochem Biophys Res Commun, 43: 1376–425.

430. Naito K, Kuriyama K (1973) Effect of morphine administration on adenyl cyclase and 30,50-cyclic nucleotide phosphodiesterase activities in the brain. Jpn. J. Pharmacol., 23: 274–276.

431. Nakagawasai O, Tadano T, Tan No K, Niijima F, Sakurada S, Endo Y, Kisara K (199) Changes in beta-endorphin and stress-induced analgesia in mice after exposure to forced walking stress. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., 21: 471–476.

432. Nakamura I, Ohta Y, Kemmotsu O (1997) Characterization of adenosine receptors mediating spinal sensory transmission related to nociceptive information in the rat. Anesthesiology, 87: 577–584.

433. Nakazi M, Bauer U, Nickel T, Kathmann M, Schlicker E (2000) Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 361: 19– 24.

434. Navarro M, Hernandez E, Munoz RM, del Arco I, Villanua MA, Carrera MR, Rodriguez de Fonseca F (1997) Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. Neuroreport, 8: 491–496.

435. Nelson LR, Taylor AN, Lewis JW, Branch BJ, Liebeskind JC (1985) Opioid but not nonopioid stress-induced analgesia is enhanced following prenatal exposure to ethanol. Psychopharmacology, 85: 92–96.

436. Nishith P, Griffin MG, Poth TL (2002) Stress-induced analgesia: prediction of posttraumatic stress symptoms in battered versus nonbattered women. Biol. Psychiatry, 51: 867–874.

437. Nishiyama T (2000) Interaction between intrathecal morphine and glutamate receptor antagonists in formalin test. Eur. J. Pharmacol., 395: 203–210.

438. Nunes-de-Souza RL, Canto-de-Souza A, da-Costa M, Fornari RV, Graeff FG, Pela IR (2000) Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. Psychopharmacology, 150: 300–310.

439. Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals, Neuron, 29: 729–738.

440. Oleson TD, Kirkpatrick DB, Goodman SJ (1980) Elevation of pain threshold to tooth shock by brain stimulation in primates. Brain Res, 194: 79–95.

441. Onodera K, Sakurada S, Furuta S, Yonezawa A, Hayashi T, Honma I, Miyazaki S (2001) Age-related differences in forced walking stress-induced analgesia in mice. Drugs Under Exp. Clin. Res., 27: 193–198.

442. Panocka I, Marek P, Sadowski B (1986) Differentiation of neurochemical basis of stress-induced analgesia in mice by selective breeding. Brain Res., 397: 156–160.

443. Panocka I, Marek P, Sadowski B (1986b) Inheritance of stress-induced analgesia in mice. Selective breeding study. Brain Res., 397: 152–155.

444. Panocka I, Marek P, Sadowski B (1991) Tolerance and cross-tolerance with morphine in mice selectively bred for high and low stress-induced analgesia. Pharmacol. Biochem. Behav., 40: 283–286.

445. Panocka I, Sadowski B, Marek P (1987) Adrenalectomy and dexamethasone differentially affect postswim antinociception in mice selectively bred for high and low stress-induced analgesia. Physiol. Behav., 40: 597–601.

446. Parker E M, Grisel DA, Iben LG, Shapiro RA (1993) A single amino acid difference accounts for the pharmacological distinctions between the rat and human 5-hydroxytryptamine1B receptors. J Neurochem, 60: 380–383.

447. Parmar N, Ho WS (2010) N-arachidonoyl glycine an endogenous lipid that acts as a vasorelaxant via nitric oxide and large conductance calcium-activated potassium channels. Br J Pharmacol, 160: 594–603.

448. Parolaro D, Massi P, Patrini G, Rubino T, Parenti M, Gori E (1991) Pertussis toxin pretreatment affects opiate/nonopiate and stress-induced analgesia differently. Pharmacol. Biochem. Behav., 38: 569–573.

449. Pate DW, Jarvinen K, Urtti A, Jarho P, Jarvinen T (1995) Ophthalmic arachidonylethanolamide decreases intraocular pressure in normotensive rabbits. Curr Eye Res, 14: 791– 797.

450. Pate DW, Jarvinen K, Urtti A, Mahadevan V, Jarvinen T (1998) Effect of the CB1 receptor antagonist, SR141716A, on cannabinoidinduced ocular hypotension in normotensive rabbits. Life Sci, 63: 2181– 2188.

451. Patricelli MP, Cravatt BF (1999) Fatty acid amide hydrolase com- petitively degrades bioactive amides and esters through a nonconventional catalytic mechanism. Biochemistry, 38: 14125– 14130.

452. Pavlovic ZW, Cooper ML, Bodnar RJ (1996) Enhancements in swim stressinduced hypothermia, but not analgesia, following amygdala lesions in rats. Physiol. Behav., 59: 77–82.

453. Pertwee RG, Joe-Adigwe G, Hawksworth GM (1996) Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in mouse vas deferens. Eur J Pharmacol, 296: 169– 172.

454. Peschanski M, Mantyh PW (1983) Efferent connections of the subfascicular area of the mesodiencephalic junction and its possible involvement in stimulationproduced analgesia. Brain Res., 263: 181–190.

455. Pielsticker A, Haag G, Zaudig M, Lautenbacher S (2005) Impairment of pain inhibition in chronic tension-type headache. Pain, 118: 215–223.

456. Pinto-Ribeiro F, Almeida A, Pego JM, Cerqueira J, Sousa N (2004) Chronic unpredictable stress inhibits nociception in male rats. Neurosci. Lett., 359: 73–76.

457. Ploghaus A, Narain C, Beckmann CF, Clare S, Bantick S, Wise R, Matthews PM, Rawlins JN, Tracey I (2001) Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. J. Neurosci., 21: 9896–9903.

458. Ploghaus A, Tracey I, Gati JS, Clare S, Menon RS, Matthews PM, Rawlins JN (1999) Dissociating pain from its anticipation in the human brain. Science, 284: 1979–1981.

459. Porter A, Felder C (2001) Pharmacology & Therapeutics, 90: 45–60

460. Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. J. Pharmacol. Exp. Ther., 301: 1020–1024.

461. Portier M, Rinaldi-Carmona M, Pecceu F, Combes T, Poinot-Chazel C, Calandra B, Barth F, le Fur G, Casellas P (1999) SR 144528, an antagonist for the peripheral cannabinoid receptor that behaves as an inverse agonist. J Pharmacol Exp Ther, 288: 582– 589.

462. Price DD (2000) Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. Science, 288: 1769–1772.

463. Priestman SG, Priestman TJ, Canney PA (1987) A double-blind randomised cross-over comparison of nabilone and metoclopramide in the control of radiation-induced nausea. Clin Radiol, 38: 543– 544.

464. Priller J, Briley EM, Mansouri J, Devane WA, Mackie K, Felder CC (1995) Mead ethanolamide, a novel eicosanoid, is an agonist for the central (CB1) and peripheral (CB2) cannabinoid receptors. Mol Pharmacol, 48: 288– 292.

465. Przewlocka B, Sumova A, Lason W (1990) The influence of conditioned fearinduced stress on the opioid systems in the rat. Pharmacol. Biochem. Behav., 37: 661–666.

466. Puglisi-Allegra S, Castellano C, Oliverio A (1982) Circadian variations in stress-induced analgesia. Brain Res, 252: 373–376.

467. Puglisi-Allegra S, Oliverio A (1983) Social isolation: effects on pain threshold and stress-induced analgesia. Pharmacol Biochem Behav, 19: 679–681.

468. Pulvirenti L, Kastin AJ (1988) MIF-1 reduces stress-induced eating in rats. New Trends Exp Clin Psychiat, 4: 229–33.

469. Rakhshan F, Day TA, Blakely RD, Barker EL (2000) Carriermediated uptake of the endogenous cannabinoid anandamide in RBL- 2H3 cells. J Pharmacol Exp Ther, 292: 960–967.

470. Randall MD, Kendall DA (1998) Endocannabinoids: a new class of vasoactive substances. Trends Pharmacol Sci, 19: 55–58.

471. Rea, K., Roche, M., Finn, D.P., 2007. Supraspinal modulation of pain by cannabinoids: the role of GABA and glutamate. Br. J. Pharmacol. 152, 633–648.

472. Redding TW, Kastin AJ, Gonzalez-Barcena D, Coy DH, Hirotsu Y, Ruelas J, et al., 1974. The disappearance, excretion, and metabolism of tritiated prolyl-leucyl-glycinamide in man. Neuroendocrinology 16, 119–26.

473. Redding TW, Kastin AJ, Nair RMG, Schally AV (1973) The distribution, half-life, and excretion of 14C and 3H-labeled L-prolyl-L-leucyl-glycinamide in the rat. Neuroendocrinology, 11: 92–100.

474. Renlund S, Erlandsson I, Hellman U, Silberring J, Wernstedt C, Lindstrom L (1993) Micropurification and amino acid sequence of beta-casomorphin-8 in milk from a woman with postpartum psychosis. Peptides, 14: 1125–32.

475. Rhodes DL, Liebeskind JC (1978) Analgesia from rostral brain stem stimulation in the rat. Brain Res., 143: 521–532.

476. Rhudy JL, Grimes JS, Meagher MW (2004) Fear-induced hypoalgesia in humans: effects on low intensity thermal stimulation and finger temperature. J. Pain, 5: 458–468.

477. Rhudy JL, Meagher MW (2000) Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. Pain, 84: 65–75.

478. Rhudy JL, Meagher MW (2001) Noise stress and human pain thresholds: divergent effects in men and women. J. Pain, 2: 57–64.

479. Rhudy JL, Meagher MW (2003) Individual differences in the emotional reaction to shock determine whether hypoalgesia is observed. Pain Med., 4: 244–256.

480. Rice W, Shannon JM, Burton F, Fiedeldey D (1997) Expression of a brain-type cannabinoid receptor (CB1) in alveolar Type II cells in the lung: regulation by hydrocortisone. Eur J Pharmacol, 327: 227– 232.

481. Richfield EK, Herkenham M (1994) Selective vulnerability in Huntington's disease: preferential loss of cannabinoid receptors in lateral globus pallidus. Ann Neurol, 36: 577–584.

482. Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Shire D, Bouaboula M, Oustric D, Barth F, Casellas P, Ferrara P, Le Fur G (1996) Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. J Pharmacol Exp Ther, 278: 871–878.

483. Rinaldi-Carmona M, Le Duigou A, Oustric D, Barth F, Bouaboula M, Carayon P, Casellas P, Le Fur G (1998) Modulation of CB1 cannabinoid receptor functions after a long-term exposure to agonist or inverse agonist in the Chinese hamster ovary cell expression system. J Pharmacol Exp Ther, 287: 1038–1047.

484. Rivat C, Laboureyras E, Laulin JP, Le Roy C, Richebe P, Simonnet G (2007) Nonnociceptive environmental stress induces hyperalgesia, not analgesia, in pain and opioid-experienced rats. Neuropsychopharmacology, 32(10): 2217-2228.

485. Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ (2002) Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 99: 8384–8388.

486. Robinson DA, Wei F, Wang GD, Li P, Kim SJ, Vogt SK, Muglia LJ, Zhuo M (2002) Oxytocin mediates stress-induced analgesia in adult mice. J. Physiol., 540: 593–606.

487. Roche M, O'Connor E, Diskin C, Finn DP (2007) The effect of CB(1) receptor antagonism in the right basolateral amygdala on conditioned fear and associated analgesia in rats. Eur. J. Neurosci., 26: 2643–2653.

488. Rodgers RJ, Hendrie CA (1983) Social conflict activates status-dependent endogenous analgesic or hyperalgesic mechanisms inmale mice: effects of naloxone on nociception and behaviour. Physiol Behav, 30: 775–780.

489. Rodgers RJ, Randall JI (1987) Benzodiazepine ligands, nociception and 'defeat' analgesia in male mice. Psychopharmacology, 91: 305–315.

490. Rodriguez de Fonseca F, Carrera MRA, Navarro M, Koob GF, Weiss F (1997) Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. Science, 276: 2050– 2054.

491. Rodriguez de Fonseca F, Del Arco I, Martin-Calderon JL, Gorriti MA, Navarro M (1998) Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. Neurobiol Dis, 5: 483–501.

492. Rodriguez de Fonseca F, Ramos JA, Bonnin A, Fernandez-Ruiz JJ (1993) Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. Neuroreport, 4: 135– 138.

493. Romero MT, Bodnar RJ (1986) Gender differences in two forms of cold-water swim analgesia. Physiol. Behav., 37: 893–897.

494. Romero MT, Kepler KL, Bodnar RJ (1988) Gender determinants of opioid mediation of swim analgesia in rats. Pharmacol. Biochem. Behav., 29: 705–709.

495. Romero MT, Kepler KL, Cooper ML, Komisaruk BR, Bodnar RJ (1987) Modulation of gender-specific effects upon swim analgesia in gonadectomized rats. Physiol. Behav., 40: 39–45.

496. Rosecrans JA, Robinson SE, Johnson JH, Mokler DJ, Hong JS (1986) Neuroendocrine, biogenic amine and behavioral responsiveness to a repeated footshock- induced analgesia (FSIA) stressor in Sprague–Dawley (CD) and Fischer- 344 (CDF) rats. Brain Res., 382: 71–80.

497. Rosen JB, Davis M (1990) Enhancement of electrically elicited startle by amygdaloid stimulation. Physiol. Behav., 48: 343–349.

498. Rubinstein M, Mogil JS, Japon M, Chan EC, Allen RG, Low MJ (1996) Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking beta-endorphin by sitedirected mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93: 3995–4000.

499. Russo E (1998) Cannabis for migraine treatment: the once and future prescription? An historical and scientific review. Pain, 76: 3–8.

500. Ryan, S.M., Maier, S.F., 1988. The estrous cycle and estrogen modulate stressinduced analgesia. Behav. Neurosci. 102, 371–380.

501. Sacharczuk M, Jaszczak K, Sadowski B (2003) Cytogenetic comparison of the sensitivity to mutagens inmice selected for high (HA) and low (LA) swim stressinduced analgesia. Mutat. Res., 535: 95–102.

502. Sacharczuk M, Juszczak G, Sliwa AT, Tymosiak-Zielinska A, Lisowski P, Jaszczak K, Pluta R, Lipkowski A, Sadowski B, Swiergiel AH (2008) Differences in ethanol drinking between mice selected for high and low swim stress-induced analgesia. Alcohol, 42: 487–492.

503. Sadowski B, Konarzewski M (1999.)Analgesia in selectively bred mice exposed to cold in helium/oxygen atmosphere. Physiol. Behav., 66: 145–151.

504. Sadowski B, Panocka I (1993) Cross-tolerance between morphine and swim analgesia in mice selectively bred for high and low stress-induced analgesia. Pharmacol. Biochem. Behav., 45: 527–531.

505. Sander G, Kastin AJ, Giles TD (1982) MIF-1 does not act like naloxone in antagonizing the cardiovascular activity of leucine-enkephalin in the conscious dog. Pharmacol Biochem Behav, 17: 1301–3.

506. Sanudo-Pena MC, Patrick SL, Khen S, Patrick RL, Tsou K, Walker JM (1998) Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. Neurosci Lett, 248: 171– 174.

507. Schally AV, Kastin AJ (1966) Purification of a bovine hypothalamic factor which elevates pituitary MSH levels in rats. Endocrinology, 79: 768–72.

508. Schmid HH, Schmid PC, Natarajan V 1996 The N-acylationphosphodiesterase pathway and cell signalling. Chem Phys Lipids, 80: 133– 142.

509. Schmid PC, Krebsbach RJ, Perry SR, Dettmer TM, Maasson JL, Schmid HH (1995) Occurrence and postmortem generation of anandamide and other long-chain N-acylethanolamines in mammalian brain. FEBS Lett, 375: 117– 120.

510. Schmid PC, Kuwae T, Krebsbach RJ, Schmid HH (1997a) Anandamide and other N-acylethanolamines in mouse peritoneal macrophages. Chem Phys Lipids, 87: 103– 110.

511. Schmid PC, Paria BC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Dey SK (1997b) Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. Proc Natl Acad Sci USA 94: 4188– 4192.

512. Schmid PC, Zuzarte-Augustin ML, Schmid HH (1985) Properties of rat liver N-acylethanolamine amidohydrolase. J Biol Chem, 260: 14145–14149.

513. Scimonelli T, Celis ME (1982) Inhibition by L-prolyl-L-leucylglycinamide (PLG) of alpha-melanocyte stimulating hormone release from hypothalamic slices. Peptides, 3: 885–9.

514. Seta KA, Jansen HT, Kreitel KD, Lehman M, Behbehani MM (2001) 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. 86: 145–152.

515. Shen, M., Thayer, S. A. (1998). Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. Mol Pharmacol 54, 459– 462.

516. Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer SA (1996) Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. J Neurosci, 16: 4322– 4334.

517. Sherman AD, Gebhart GF (1974) Pain-induced alteration of glutamate in periaqueductal central gray and its reversal by morphine. Life Sci., 15: 1781–1789.

518. Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P (1995) An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. J Biol Chem 270, 3726– 3731.

519. Shohami E, Novikov M, Mechoulam R (1993) A nonpsychotropic cannabinoid, HU-211, has cerebroprotective effects after closed head injury in the rat. J Neurotrauma, 10: 109–119.

520. Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Abood ME (1996) Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. J Pharmacol Exp Ther, 278: 989– 999.

521. Sivam SP, Ho IK (1983) GABAergic drugs, morphine and morphine tolerance: a study in relation to nociception and gastrointestinal transit in mice. Neuropharmacology, 22: 767–774.

522. Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB (2000) The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). Br J Pharmacol, 129: 227– 230.

523. Smith FL, Fujimori K, Lowe J, Welch SP (1998) Characterization of delta9-tetrahydrocannabinol and anandamide antinociception in nonarthritic and arthritic rats. Pharmacol. Biochem. Behav, 60: 183–191.

524. Smith PB, Welch SP, Martin BR (1994) Interactions between delta 9-tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. J Pharmacol Exp Ther, 268: 1381– 1387.

525. Snow AE, Tucker SM, Dewey WL (1982) The role of neurotransmitters in stressinduced antinociception (SIA). Pharmacol. Biochem. Behav, 16: 47–50.

526. Soderstrom K, Leid M, Moore FL, Murray TF (2000) Behavioral, pharmacological, and molecular characterization of an amphibian cannabinoid receptor. J Neurochem, 75: 413–423.

527. Soleimannejad E, Naghdi N, Semnanian S, Fathollahi Y, Kazemnejad A (2007) Antinociceptive effect of intra-hippocampal CA1 and dentate gyrus injection of MK801 and AP5 in the formalin test in adult male rats. Eur. J. Pharmacol., 562: 39–46.

528. Sommer C (2006) Is serotonin hyperalgesic or analgesic? Curr. Pain Headache Rep, 10: 101–106.

529. Song ZH, Slowey CA (2000) Involvement of cannabinoid receptors in the intraocular pressure-lowering effects of WIN55212-2. J Pharmacol Exp Ther, 292: 136– 139.

530. Spinella M, Cooper ML, Bodnar RJ (1996) Excitatory amino acid antagonists in the rostral ventromedial medulla inhibit mesencephalic morphine analgesia in rats. Pain, 64: 545–552.

531. Staud R, Robinson ME, Vierck Jr CJ, Price DD (2003) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) attenuate temporal summation of second pain in normal males but not in normal females or fibromyalgia patients. Pain, 101: 167–174.

532. Staud R, Vierck CJ, Robinson ME, Price DD (2004) Spatial summation of heat pain within and across dermatomes in fibromyalgia patients and pain-free subjects. Pain, 111: 342–350.

533. Sternberg WF (1999) Sex differences in the effects of prenatal stress on stressinduced analgesia. Physiol. Behav, 68: 63–72.

534. Sternberg WF, Liebeskind JC (1995) The analgesic response to stress: genetic and gender considerations. Eur. J. Anaesthesiol., 10: 14–17.

535. Stiller CO, Bergquist J, Beck O, Ekman R, Brodin E (1996) Local administration of morphine decreases the extracellular level of GABA in the periaqueductal gray matter of freely moving rats. Neurosci. Lett., 209: 165–168.

536. Stolberg A, Frenk H (1995) Development of water-immersion produced analgesia. Dev. Psychobiol. 28: 247–255.

537. Straiker AJ, Maguire G, Mackie K, Lindsey J (1999) Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina. Invest Ophthalmol Vis Sci, 40: 2442– 2448.

538. Sugiura T, Kondo S, Kishimoto S, Miyashita T, Nakane S, Kodaka T, Suhara Y, Takayama H, Waku K (2000) Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. J Biol Chem, 27: 605–612.

539. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. Biochem. Biophys. Res. Commun., 215: 89–97.

540. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Tonegawa T, Nakane S, Yamashita A, Ishima Y, Waku K (1996a) Transacylase-mediated and phosphodiesterase-mediated synthesis of N-arachidonoylethanolamine, an endogenous cannabinoid-receptor ligand, in rat brain microsomes. Comparison with synthesis from free arachidonic acid and ethanolamine. Eur J Biochem, 240: 53–62.

541. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Tonegawa T, Nakane S, Yamashita A, Waku K (1996b) Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca(2+)-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. Biochem Biophys Res Commun, 218: 113–117.

542. Suh H, Song D, Huh S, Kim YH (2000) Differential potentiative effects of glutamate receptor antagonists in the production of antinociception induced by opioids administered intrathecally in the mouse. Brain Res. Bull., 52: 143–150.

543. Suplita RL, Gutierrez T, Fegley D, Piomelli D, Hohmann AG (2006) Endocannabinoids at the spinal level regulate, but do not mediate, nonopioid stress-induced analgesia. Neuropharmacology, 50: 372–379.

544. Sutherland RJ, O'Brien J, Lehmann H (2008) Absence of systems consolidation of fear memories after dorsal, ventral, or complete hippocampal damage. Hippocampus, 18: 710–718.

545. Szabo B, Muller T, Koch H (1999) Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. J Neurochem, 73: 1084–1089.

546. Takahashi LK, Baker EW, Kalin NH (1990) Ontogeny of behavioral and hormonal responses to stress in prenatally stressed male rat pups. Physiol. Behav., 47: 357–364.

547. Takahashi M, Tokuyama S, Kaneto H (1987) Implication of endogenous opioid mechanism in the production of the antinociceptive effect induced by psychological stress in mice. Jpn. J. Pharmacol. 44: 283–291.

548. Talbot JD, Duncan GH, Bushnell MC (1989) Effects of diffuse noxious inhibitory controls (DNICs) on the sensory-discriminative dimension of pain perception. Pain, 36: 231–238.

549. Tejwani, G.A., Richard 3rd, C.W., 1986. Effect of electrolytic and chemical ventromedial hypothalamic lesions on food intake, body weight, analgesia and the CNS opioid peptides in rats and mice. NIDA Res. Monograph 75, 497–500.

550. Terman GW, Liebeskind JC (1986) Relation of stress-induced analgesia to stimulation-produced analgesia. Ann. N.Y. Acad. Sci., 467: 300–308.

551. Terman GW, Shavit Y, Lewis JW, Cannon JT, Liebeskind JC (1984) Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. Science, 226: 1270–1277.

552. Teskey GC, Kavaliers M (1985) Prolyl-leucyl-glycinamide reduces aggression and blocks defeat-induced opioid analgesia in mice. Peptides, 6: 165–167.

553. Thurston CL, Randich A (1992) Effects of vagal afferent stimulation on ON and OFF cells in the rostroventral medulla: relationships to nociception and arterial blood pressure. J. Neurophysiol., 67: 180–196.

554. Tian WN, Miller DD, Deth RC (2000) Bidirectional allosteric effects of agonists and GTP at alpha(2A/D)-adrenoceptors. J Pharmacol Exp Ther, 292: 664– 671.

555. Tjølsen A, Lund A, Eide PK, Berge OG, Hole K 1989) An improved method for tail-flick testing with adjustment for tail-skin temperature. J. Neurosci. Methods, 26: 259–265.

556. Todd AR (1946) Hashish. Experientia 2, 55–60. Twitchell, W., Brown, S., Mackie, K. (1997). Cannabinoids inhibit Nand P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. J Neurophysiol, 78: 43– 50.

557. Tokuyama S, Takahashi M, Kaneto H (1992) Participation of GABAergic systems in the production of antinociception by various stresses in mice. Jpn. J. Pharmacol., 60: 105–110.

558. Tracey I, Ploghaus A, Gati JS, Clare S, Smith S, Menon RS, Matthews PM (2002) Imaging attentional modulation of pain in the periaqueductal gray in humans. J. Neurosci., 22: 2748–2752.

559. Truesdell LS, Bodnar RJ (1987) Reduction in cold-water swim analgesia following hypothalamic paraventricular nucleus lesions. Physiol. Behav., 39: 727–731.

560. Twillman RK (2007) Mental disorders in chronic pain patients. J. Pain Palliative Care Pharm., 21: 13–19.

561. Ueda N, Yamamoto S (2000) Anandamide amidohydrolase (fatty acid amide hydrolase). Prostaglandins Other Lipid Mediat, 61: 19–28.

562. Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto K, Yamamoto S (1997) Anandamide amidohydrolase from porcine brain. Partial purification and characterization. Adv Exp Med Biol, 407: 323–328.

563. Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T (1995) Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. J Biol Chem, 270: 23823–23827.

564. Ukponmwan OE, Rupreht J, Dzoljic MR (1984) REM sleep deprivation decreases the antinociceptive property of enkephalinase-inhibition, morphine and coldwater- swim. Gen. Pharmacol., 15: 255–258.

565. Urca G, Nof A, Weissman BA, Sarne Y (1983) Analgesia induced by electroconvulsive shock: brain enkephalins may mediate tolerance but not the induction of analgesia. Brain Res., 260: 271–277.

566. Valentino RJ, Van Bockstaele E (2008) Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. Eur. J. Pharmacol., 583: 194–203.

567. Valet M, Sprenger T, Boecker H, Willoch F, Rummeny E, Conrad B, Erhard P, Tolle TR (2004) Distraction modulates connectivity of the cingulo-frontal cortex and the midbrain during pain—an fMRI analysis. Pain, 109: 399–408.

568. Valverde O, Ledent C, Beslot F, Parmentier M, Roques BP (2000) Reduction of stress-induced analgesia but not of exogenous opioid effects in mice lacking CB1 receptors. Eur. J. Neurosci., 12: 533–539.

569. van der Kolk BA, Greenberg MS, Orr SP, Pitman RK (1989) Endogenous opioids, stress induced analgesia, and posttraumatic stress disorder. Psychopharmacology bulletin, 25: 417–421.

570. VanDenBerg CM, Kazmi Y, Jann MW (2000) Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease in the elderly. Drugs Aging, 16: 123–138.

571. Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G (1998) Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin- induced hypotension. FASEB J, 12: 1035– 1044.

572. Vasquez C, Lewis DL (1999) The CB1 cannabinoid receptor can sequester G-proteins, making them unavailable to couple to other receptors. J Neurosci, 19: 9271– 9280.

573. Vaughan CW (2006) Stressed-out endogenous cannabinoids relieve pain. Trends Pharmacol. Sci., 27: 69–71.

574. Vianna DM, Carrive P (2005) Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. Eur. J. Neurosci., 9: 2505–2512.

575. Vidrio H, Sanchez-Salvatori MA, Medina M (1996) Cardiovascular effects of (_)-11-OH-delta 8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl in rats. J Cardiovasc Pharmacol, 28: 332–336.

576. Villanueva, L., Le Bars, D., 1995. The activation of bulbo-spinal controls by peripheral nociceptive inputs: diffuse noxious inhibitory controls. Biol. Res. 28, 113–125.

577. Vrinten DH, Gispen WH, Groen GJ, Adan RA (2000) Antagonism of the melanocortin system reduces cold and mechanical allodynia in mononeuropathic rats. J. Neurosci., 20: 8131–8137.

578. Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G (1997) Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. Nature, 390: 518– 521.

579. Wagner JA, Varga K, Jarai Z, Kunos G (1999) Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. Hypertension, 33: 429– 434.

580. Walker JM, Huang SM, Strangman NM, Tsou K, Sanudo-Pena MC (1999) Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 12198–12203.

581. Walsh DM, Liggett C, Baxter D, Allen JM (1995) A double-blind investigation of the hypoalgesic effects of transcutaneous electrical nerve stimulation upon experimentally induced ischaemic pain. Pain, 61: 39–45.

582. Walter R, Neidle A, Marks N (1975) Significant differences in the degradation of pro-leu-gly-nH2 by human serum and that of other species. Proc Soc Exp Biol Med, 148: 98–103.

583. Washington LL, Gibson SJ, Helme RD (2000) Age-related differences in the endogenous analgesic response to repeated cold water immersion in human volunteers. Pain, 89: 89–96.

584. Watanabe, K., Ogi, H., Nakamura, S., Kayano, Y., Matsunaga, T., Yoshimura, H., Yamamoto, I. (1998). Distribution and characterization of anandamide amidohydrolase in mouse brain and liver. Life Sci 62, 1223– 1229.

585. Watanabe S, Kuwaki T, Yanagisawa M, Fukuda Y, Shimoyama M (2005) Persistent pain and stress activate pain-inhibitory orexin pathways. Neuroreport, 16: 5–8.

586. Watkins LR, Cobelli DA, Mayer DJ (1982) Opiate vs non-opiate footshock induced analgesia (FSIA): descending and intraspinal components. Brain Res, 245: 97–106.

587. Watkins LR, Johannessen JN, Kinscheck IB, Mayer DJ (1984) The neurochemical basis of footshock analgesia: the role of spinal cord serotonin and norepinephrine. Brain Res, 290: 107–117.

588. Watkins LR, Mayer DJ (1982) Involvement of spinal opioid systems in footshockinduced analgesia: antagonism by naloxone is possible only before induction of analgesia. Brain Res, 242: 309–326.

589. Watkins LR, Wiertelak EP, Grisel JE, Silbert LH, Maier SF (1992) Parallel activation of multiple spinal opiate systems appears to mediate ‘non-opiate’ stress-induced analgesias. Brain Res, 594: 99–108.

590. Watkins LR, Wiertelak EP, Maier SF (1993) The amygdala is necessary for the expression of conditioned but not unconditioned analgesia. Behav. Neurosci., 107: 402–405.

591. Watson SJ, Benson JA, Jr Joy JE (2000) Marijuana and medicine: assessing the science base: a summary of the 1999 Institute of Medicine report. Arch Gen Psychiatry, 57: 547–552.

592. Welch SP, Stevens DL (1992) Antinociceptive activity of intrathecally administered cannabinoids alone, and in combination with morphine, in mice. J Pharmacol Exp Ther, 262: 10–18.

593. Werka T (1994) Post-stress analgesia in rats with partial amygdala lesions. Acta Neurobiol. Exp, 54: 127–132.

594. Werka T (1997) The effects of the medial and cortical amygdala lesions on poststress analgesia in rats. Behav. Brain Res., 86: 59–65.

595. Werka T, Marek P (1990) Post-stress analgesia after lesions to the central nucleus of the amygdala in rats. Acta Neurobiol. Exp., 50: 13–22.

596. Whipple B, Komisaruk BR (1985) Elevation of pain threshold by vaginal stimulation in women. Pain 21: 357–367.

597. Wideman CH, Murphy HM, McCartney SB (1996) Interactions between vasopressin and food restriction on stress-induced analgesia. Peptides, 17: 63–66.

598. Wiebe JP, Kavaliers M (1988) Analgesic effects of the putative FSH-suppressing gonadal steroid, 3 alpha-hydroxy-4-pregnen-20-one: possible modes of action. Brain Res, 461: 150–157.

599. Wiech K, Kalisch R, Weiskopf N, Pleger B, Stephan KE, Dolan RJ (2006) Anterolateral prefrontal cortex mediates the analgesic effect of expected and perceived control over pain. J. Neurosci., 26: 11501–11509.

600. Wiedenmayer CP, Barr GA (2000) Mu opioid receptors in the ventrolateral periaqueductal gray mediate stress-induced analgesia but not immobility in rat pups. Behav. Neurosci., 114: 125–136.

601. Wiedenmayer CP, Goodwin GA, Barr GA (2000) The effect of periaqueductal gray lesions on responses to age-specific threats in infant rats. Brain Res. Dev. Brain Res., 120: 191–198.

602. Wiertelak EP, Smith KP, Furness L, Mooney-Heiberger K, Mayr T, Maier SF, Watkins LR (1994) Acute and conditioned hyperalgesic responses to illness. Pain, 56: 227–234.

603. Willer JC, Boureau F, Albe-Fessard D (1979) Supraspinal influences on nociceptive flexion reflex and pain sensation in man. Brain Res, 179: 61–68.

604. Willer JC, Dehen H, Cambier J (1981) Stress-induced analgesia in humans: endogenous opioids and naloxone-reversible depression of pain reflexes. Science, 212: 689–691.

605. Willer JC, Le Bars D, De Broucker T (1990) Diffuse noxious inhibitory controls in man: involvement of an opioidergic link. Eur. J. Pharmacol., 182: 347–355.

606. Williams CM, Kirkham TC (1999) Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. Psychopharmacology, 143: 315– 317.

607. Wilson RI, Kunos G, Nicoll RA (2001) Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. Neuron, 31: 453–462.

608. Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. Nature, 410: 588–592.

609. Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA (1995) Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. Life Sci 57: 411 –441.

610. Wright DM, Lincoln DW (1985) Stress-induced analgesia evoked by intraperitoneal injection of hypertonic saline: evidence for its occurrence in vasopressin deficient rats. Physiol. Behav., 34: 691–695.

611. Xu XJ, Zhang X, Hokfelt T, Wiesenfeld-Hallin Z (1995) Plasticity in spinal nociception after peripheral nerve section: reduced effectiveness of the NMDA receptor antagonist MK-

801 in blocking wind-up and central sensitization of the flexor reflex. Brain Res, 670: 342–346.

612. Yang Y, Chiu T (1997) Opioid and antiopioid actions of Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 and hemorphin-4 on rat locus coeruleus neurons: intracellular recording in vitro. Chin J Physiol, 40: 131–135.

613. Yang HY, Karoum F, Felder C, Badger H, Wang TC, Markey SP (1999) GC/MS analysis of anandamide and quantification of Narachidonoylphosphatidylethanolamides in various brain regions, spinal cord, testis, and spleen of the rat. J Neurochem, 72: 1959–1968.

614. Yates ML, Barker EL (2009) Inactivation and biotransformation of the endogenous cannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol. Mol Pharmacol, 76: 11–17.

615. Yehuda S, Kastin AJ, Coy DH (1980) Antagonistic actions of MIF-1 on the hypothermia and hypomotility induced by bendorphin or morphine. Int J Neurosci, 11: 317–320.

616. Yoshida A, Chen K, Moritani M, Yabuta NH, Nagase Y, Takemura M, Shigenaga Y (1997) Organization of the descending projections from the parabrachial nucleus to the trigeminal sensory nuclear complex and spinal dorsal horn in the rat. J. Comp. Neurol., 383: 94–111.

617. Zadina JE, Kastin AJ, Ge L-J, Brantl V (1990) Hemorphins, cytochrophins, and human b-casomorphins bind to antiopiate (Tyr-MIF-1) as well as opiate binding sites in rat brain. Life Sci, 47: PL25–30.

618. Zadina JE, Kastin AJ, Ge LJ, Gulden H, Bungart KJ (1989) Chronic, but not acute, administration of morphine alters antiopiate (Tyr-MIF-1) binding sites in rat brain. Life Sci, 44: 555–561.

619. Zadina JE, Kastin AJ, Ge L-J, Hackler L (1994) Mu, delta, and kappa opiate receptor binding of Tyr-MIF-1 and of Tyr-W-MIF-1, its active fragments, and two potent analogs. Life Sci, 55: PL461–466.

620. Zadina JE, Kastin AJ, Ge L-J (1990) Tyr-MIF-1 binding in brain is not altered by ligands selective for the GABAA/ benzodiazepine receptor. Neurosci Lett, 110: 143–147.

621. Zadina JE, Kastin AJ, Kenigs V, Bruno C, Hackler L (1993) Prolonged analgesia after intracerebroventricular Tyr-WMIF-1 (Tyr-Pro-Trp-Gly-NH2). Neurosci Lett, 155: 220–222.

622. Zadina JE, Kastin AJ, Kersh D, Wyatt A (1992) Tyr-MIF-1 and hemorphin can act as opiate agonists as well as antagonists in the guinea pig ileum. Life Sci, 51: 869–885.

623. Zadina JE, Kastin AJ, Krieg EF, Coy DH (1982) Characterization of binding sites for N-Tyr-MIF-1 (Tyr-Pro-Leu-Gly-NH2) in rat brain. Pharmacol Biochem Behav, 17: 1193–1198.

624. Zadina JE, Kastin AJ, Manasco PK, Pignatiello MF, Nastiuk KL (1987) Long-term hyperalgesia by neonatal b-endorphin and morphiceptin is blocked by neonatal Tyr-MIF-1. Brain Res, 409: 10–18.

625. Zadina JE, Kastin AJ (1985) Interactions between the antiopiate Tyr-MIF-1 and the mu opiate morphiceptin at their respective binding sites in brain. Peptides, 6: 965–970.

626. Zadina JE, Kastin AJ (1986) Interactions of Tyr-MIF-1 at opiate receptor sites. Pharmacol Biochem Behav, 25: 1303–1305.

627. Zadina JE, Paul D, Gergen KA, Ge L-J, Hackler L, Kastin AJ (1996) Binding of Tyr-W-MIF-1 (Tyr-Pro-Trp-Gly-NH2) and related peptides to m1 and m2 opiate receptors. Neurosci Lett, 215: 65–69.

628. Zamfirova R, Bocheva A, Dobrinova Y, Todorov S (2007) Study on the antinociceptive action of Tyr-K-MIF-1, a peptide from the MIF family. Auton Autacoid Pharmacol, 27: 93–98.

629. Zanardo V, Nicolussi S, Carlo G, Marzari F, Faggian D, Favaro F (2001) Beta endorphin concentrations in human milk. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 33: 160–164.

630. Zeltzer LK, Dolgin MJ, LeBaron S, LeBaron C (1991) A randomized, controlled study of behavioral intervention for chemotherapy distress in children with cancer. Pediatrics, 88: 34–42.

631. Zhang AZ, Yang HY, Costa E (1982) Nociception, enkephalin content and dipeptidyl carboxypeptidase activity in brain of mice treated with exopeptidase inhibitors. Neuropharmacology 21: 625–630.

632. Zhang R, Tomida M, Katayama Y, Kawakami Y (2004) Response durations encode nociceptive stimulus intensity in the rat medial prefrontal cortex. Neuroscience, 125: 777–785.

633. Zhang WT, Jin Z, Cui GH, Zhang KL, Zhang L, Zeng YW, Luo F, Chen AC, Han JS (2003a) 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, 982: 168–178.

634. Zhang WT, Jin Z, Huang J, Zhang L, Zeng YW, Luo F, Chen AC, Han JS (2003b) Modulation of cold pain in human brain by electric acupoint stimulation: evidence from fMRI. Neuroreport, 14: 1591–1596.

635. Zhou Z, He L, Zhou J (1993) [Expression of c-fos protein in CNS following electroacupuncture of the ‘‘quanliao’’ and the electrostimulation of the rat tail]. Zhen ci yan jiu = Acupuncture research/, 18: 14–20.

636. Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 5780– 5785.

637. Zygmunt PM, Chuang H, Movahed P, Julius D, Hogestatt ED (2000) The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. Eur J Pharmacol, 396: 39–42.

638. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt E D (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. Nature 400: 452– 457.

Списък на проекти, публикации и участия, свързани с дисертационния труд

Проекти:

1. Договор №6-Д от конкурса „Млад изследовател” за 2010-2011г.: “Взаимодействие на невропептидите MIF-1 и TYR-MIF-1 с канабиноидната система при имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия”;

2. Договор №15-Д от конкурса „Млад изследовател” за 2011-2012г.: „Ефекти на Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 върху канабиноидната система при студова стрес-индуцирана аналгезия”;

3. Договор №21 от конкурса на МУ-София, СМН, за 2010-2011г.: „Взаимодействие на някои кратки невропептиди с *CB1* рецепторите в *PERIAQUEDUCTAL GRAY* на плъх при имобилизационен стрес”;

4. Договор №23 от конкурса на МУ-София, СМН, за 2011-2012г.: „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. Бочева А. и **Хр. Ночева**. (2011) Стрес-индуцирана аналгезия и ендоканабиноидна система. Здраве и Наука, I, 003, 42-46.

2. **Nocheva H**, Kochev D, Bocheva A. (2013) Effects of *Tyr-MIF-1* family of peptides on endocannabinoid system after immobilization stress. Доклади на БАН (in press).

3. **Nocheva H**, Kochev D, Krastev D, Bocheva A. (2013) COLD STRESS-INDUCED ANALGESIA: INTERACTIONS BETWEEN THE *TYR-MIF-1* FAMILY OF PEPTIDES AND THE ENDOCANNABINOID SYSTEM. Доклади на БАН (in press).

4. Bozhilova-Pastirova A, **Nocheva H**, Malinova L, Landzhov B, Krastev N, Vodenicharov E, Bocheva A. (2013) IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY OF CB1 RECEPTORS IN RAT 'S PERIAQUEDUCTAL GRAY AFTER COLD STRESS AND EFFECTS OF PEPTI DES TYR-W-MIF-1 AND TYR-K-MIF-1. *Scripta Scientifica Medica*, vol. 45 (1), 1: 47-50.

Участия:

Шеста национална конференция за изследване и лечение на болката с международно участие, гр. Хисаря, 31.05 – 02.06.2012 г.

1. Р. Хаджиолова, **Хр. Ночева**, Л. Трайков, А. Бочева. УЧАСТИЕ НА АНТАГОНИСТА НА *CB1* РЕЦЕПТОРИТЕ *AM*251 ПРИ ПРЕТРЕТИРАНИ С НАЛОКСОН ЖИВОТНИ В УСЛОВИЯ НА СТРЕС-ИНДУЦИРАНА АНАЛГЕЗИЯ;

2. **Хр. Ночева**, Л. Трайков, А. Бочева. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НА НАВРОПЕПТИДИТЕ MIF-1 И TYR-MIF-1 С ЕНДОКАНАБИНОИДНАТА СИСТЕМА ПРИ ИМОБИЛИЗАЦИОННА СТРЕС-ИНДУЦИРАНА АНАЛГЕЗИЯ;

3. Л. Трайков, **Хр. Ночева**, А. Бочева. УЧАСТИЕ НА КАНАБИНОИДНАТА СИСТЕМА ПРИ СТРЕС-ИНДУЦИРАНА АНАЛГЕЗИЯ ПРИ ПЛЪХ;

4. А. Бочева, **Хр. Ночева**, Л. Трайков. НЕВРОМОДУЛАТОРНИ ЕФЕКТИ НА НЕВРОПЕПТИДИТЕ *TYR-W-MIF-1* И *TYR-K-MIF-1* ВЪРХУ КАНАБИНОИДНАТА СИСТЕМА ПРИ СТРЕС-ИНДУЦИРАНА АНАЛГЕЗИЯ.

Годишна юбилейна конференция с международно участие, гр. Ст. Загора, 21-22.05.2012 г.

5. А. Бочева, **Хр. Ночева**. Повлияване експресията на *CB1* рецепторите в *Periaqueductal gray* от невропептидите *MIF-1* и *Tyr-MIF-1* при имобилизационен стрес;

6. **Хр. Ночева**, А. Бочева. Ефекти на невропептидите *Tyr-W-MIF-1* и *Tyr-K-MIF-1* върху опиатергичната и канабиноидната системи при студов стрес.

V-ти морфологични дни IX-та Национална конференция по антропология, София, 1-3 юни 2012 г.

7. Bocheva. A., Malinova L., **Nocheva. H**., Landzhov B., Krastev N. Interaction of Tyr-W-MIF-1 and Tyr-K-MIF-1 with *CB1*-receptors in *PAG* during immobilization stress;

8. **Nocheva H**., Bocheva A., Malinova L., A. Bozhilova-Pastirova. Interaction of Tyr-W-MIF-1 and Tyr-K-MIF-1 with CB1-receptors in PAG during cold stress.

XII International Congress of Medical Sciences, София, 09-12.05.2013 г.

9. Sussan M, **Nocheva H**, Bocheva A. Effects of Tyr-MIF-1 family of peptides on endocannabinoid system after cold stress.

10. Petrova M, Mitova V, **Nocheva H**, Bocheva. Tyr-MIF-1 family of peptides and endocannabinoid system interactions after restraint stress in rats.

11. Georgiev S, **Nocheva H**, Bocheva A. Stress induced analgesia.