**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

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на 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.**

Дисертационният труд съдържа 163 машинописни страници, включващи 23 фигури, 2 таблици и 1 графика. Библиографският списък съдържа 638 литературни източника на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет към Катедра по патофизиология, Медицински университет - София на 10.06.2013 г

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на **04.10.2013** г. от **15.00** ч. в Аула № 2 на Медицински факултет, Медицински Университет - София, ул. „Здраве" 2, съобразно Заповед на ректора № РК 36-1289/24.06.2013 г. пред научно жури в състав:

**Председател:**

1. Проф. д-р Александър Стойнев, дмн – катедра по патофизиология, МФ, МУ-София (рецензия);

**Членове:**

2. Проф. д-р Адриана Бочева, дм – катедра по патофизиология, МФ, МУ-София (становище);
3. Проф. д-р Стефан Костянев, дмн - МУ-Пловдив (становище);
4. Проф. д-р Ирен Белчева, дмн - Институт по невробиология-БАН (рецензия);
5. Доц. д-р Анелия Димитрова, дм – МУ-Плевен (становище).

**Резервни членове:**

1. доц. д-р Мария Тодорова, дм – катедра по патофизиология, МФ, МУ-София, вътрешен;
2. доц. д-р Емилия Лакова, дм - МУ-Плевен, външен.

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

**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

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

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

**Официални рецензенти**:

1. Проф. д-р Александър Георгиев Стойнев, дмн

2. Проф. д-р Ирен Белчева, дмн

**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.***

## 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 |
| $\Delta^9$-ТХК | (-)-транс-$\Delta^9$-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 Р |

## **ВЪВЕДЕНИЕ**

Стресът е комплексно динамично състояние на организма, при което нормалната хомеостаза на вътрешна среда е застрашена или нарушена. В хода на еволюцията са установени сложни физиологични механизми, които имат за цел преодоляване на стреса и са обобщени като ***стрес-отговор***. Намалените възможности за преодоляване ефектите на стреса са в основата на редица заболявания на нервната, сърдечно-съдовата, ендокринната, стомашно-чревната и др. системи. Причините, предизвикващи стрес, са от огромно значение при изясняване на механизмите за развитието на стрес-отговора, а от тук и за превенция на патологичните му прояви.

Комплексът от промени в поведението, насочени към преодоляване или избягване опасността от страна на индивида, се означава като ***fight or flight syndrome.*** Известно е, че при стрес се променят редица невро-ендокринни, психо-физиологични, имунни функции на организма. Наред с това стресът предизвиква аналгезия, която е наречена ***стрес-индуцирана аналгезия (СИА)***. Този важен феномен е свързан с болковата перцепция 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 се състои от четири ендогенни невропептида - MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1, Tyr-K-MIF-1, които са открити в ЦНС и 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 които участват опиоидергичната, азотноокисната, хистаминергичната и адренергичната невромедиаторни системи. Пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 повлияват стрес-индуцираната аналгезия.

Ендоканабиноидната система (ЕКС) има значение за модулирането на стрес-отговора на организма, т.е. тя участва при стрес-индуцираната аналгезия..

При нарушения на ендоканабиноидната секреция и/или медиация се отключват и развиват някои патологични състояния или неврологични заболявания. Тя има роля в развитието на 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. Доказано е, че ендоканабиноидната система оказва кардиопротективно и противовъзпалително действие.

Ето защо изучаването на ЕКС и нейните взаимовръзки с други системи би имало практическо приложение в различни области на медицината.

Целта на настоящия труд бе да се изучат ефектите на невропептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху 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.

## 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 система 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 след 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

**Целта** на настоящия труд бе:

**1.** Да се изследват ефектите на MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1, 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 целта 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 имобилизационен и студов стрес.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Експериментите бяха проведени върху 246 мъжки бели плъхове линия Wistar (180-200 г). Животните бяха оглеждани 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 аналгезия се отчита по специфична двигателна реакция на плъха, която се състои в отдръпване на лапката при достигане на болковия праг. Отчитат се относителни единици, съгласно скалата на апарата (Randall-Selitto, 1957).

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.

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.

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

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛИ:**

Животните бяха разпределени в групи по 6. Всички вещества бяха въвеждани интраперитонеално (i.p.). Анандамид (агонист на CB1-рецепторите) бе въвеждан в доза от 1 мг/кг, а антагонистът на CB1-рецепторите AM251- в доза 1,25 мг/кг. И двете субстанции бяха разтворени в DMSO. В зависимост от опитната постановка агонистът и антагонистът на канабиноидните рецептори бяха въвеждани: в интактни животни; веднага след прекратяване на стрес-процедурата; след стрес и 20 мин след Naloxone hydrochloride dehydrate, който бе въвеждан в доза 1 мг/кг, i.p.

Пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 - MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 бяха разтворени във физиологичен разтвор. В зависимост от опитната постановка пептидите бяха въвеждани в доза 1мг/кг: 10 мин след анандамид или AM251; 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 за 1 час на стайна температура. След неколкократно промиване в 0.1 *M* фосфатен буфер с *pH* 7.4 материалът се поставяше в буфер и оставяше да пренощува при температура 4°C. Приготвяха се серийни срези на замразяващ микротом (*Reihart-Jung*), като всеки седми срез с дебелина 40 μм се използваше при изследването.

*Имунохистохимия* - бяха използвани белязани антитела за CB1-невронални елементи.

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

*Статистическа обработка* - експерименталните данни бяха 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 ± *SEM*).

# Резултати

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

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

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 мин. 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.

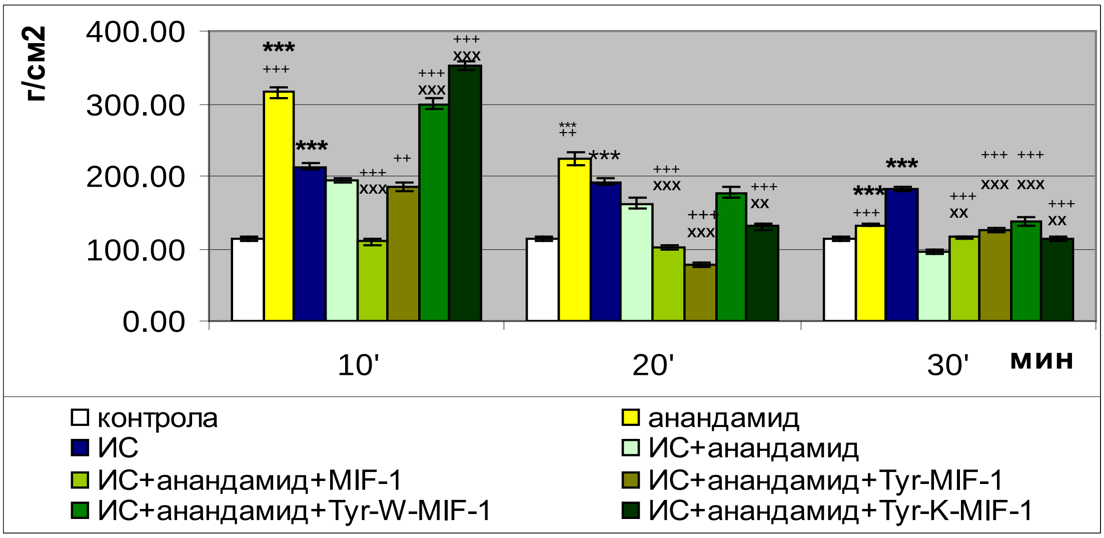
Студовият стрес предизвика статистически достоверно ($p<0.001$) по-висок болков праг в сравнение с интактните животни за целия период на изследването (Фиг. 5, 7, 13, 15). HP-латентността бе статистически достоверно удължена ($p<0.001$) на 10-та и 20-та мин. от изследването, докато на 30-та мин. се наблюдаваше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

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

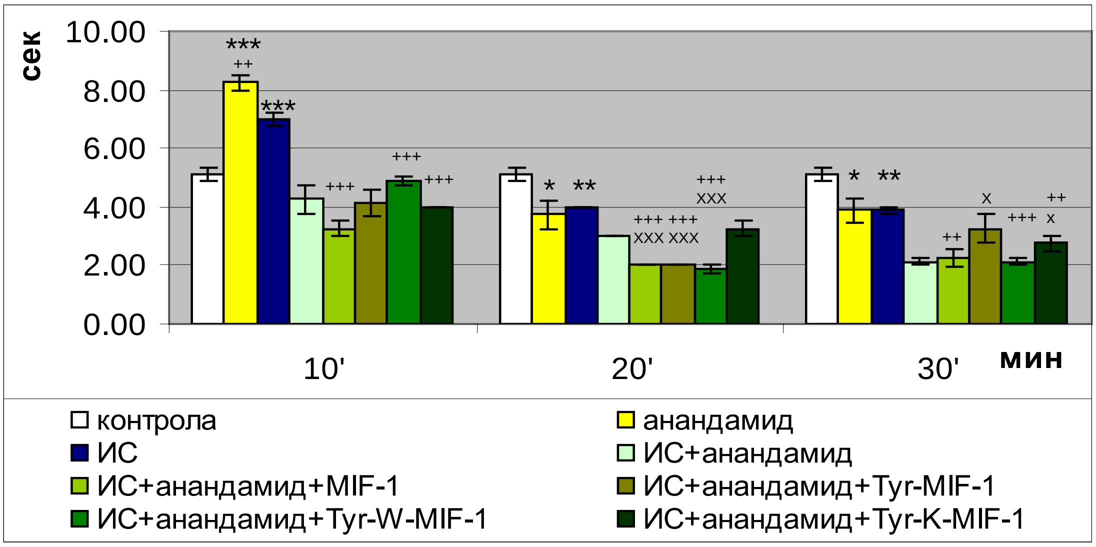
Системното въвеждане на канабиноиди в различни области на ЦНС предизвиква аналгезия (Walker and Hohmann, 2005). Доказано е участието на PAG (Lichtman et al., 1995), таламуса (Martin et al., 1996), ростралната вентромедиална медула (Martin et al., 1998; Meng et al., 1998) и амигдалата (Martin et al.,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

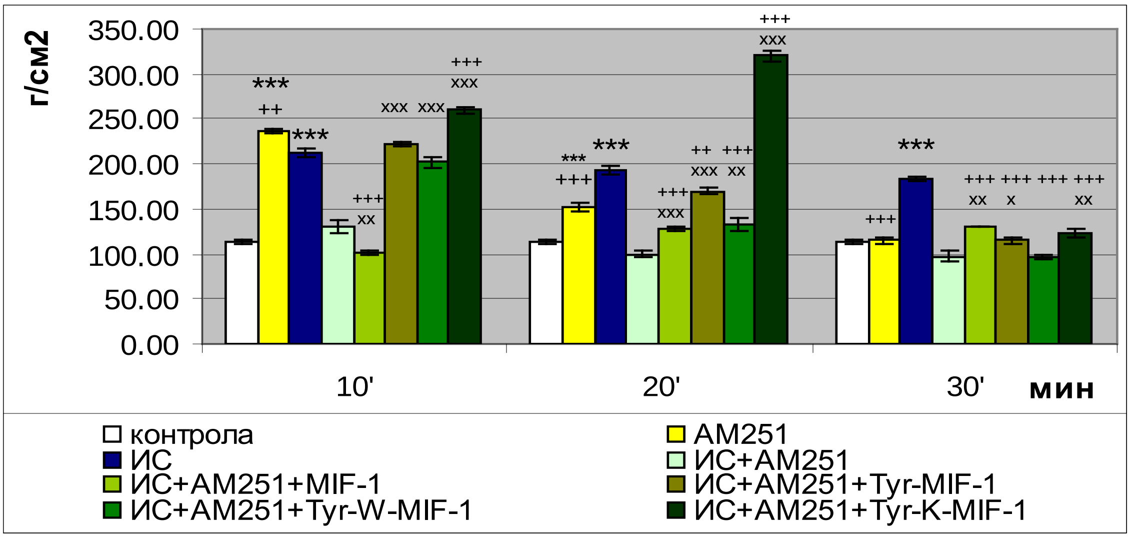



**Фиг. 2.** *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг, i.p.) и анандамид (доза 1 мг/кг, i.p.) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия при HP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001, ** p>0.01, * p>0.05 спрямо контролата; +++ p>0.001, ++ p>0.01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

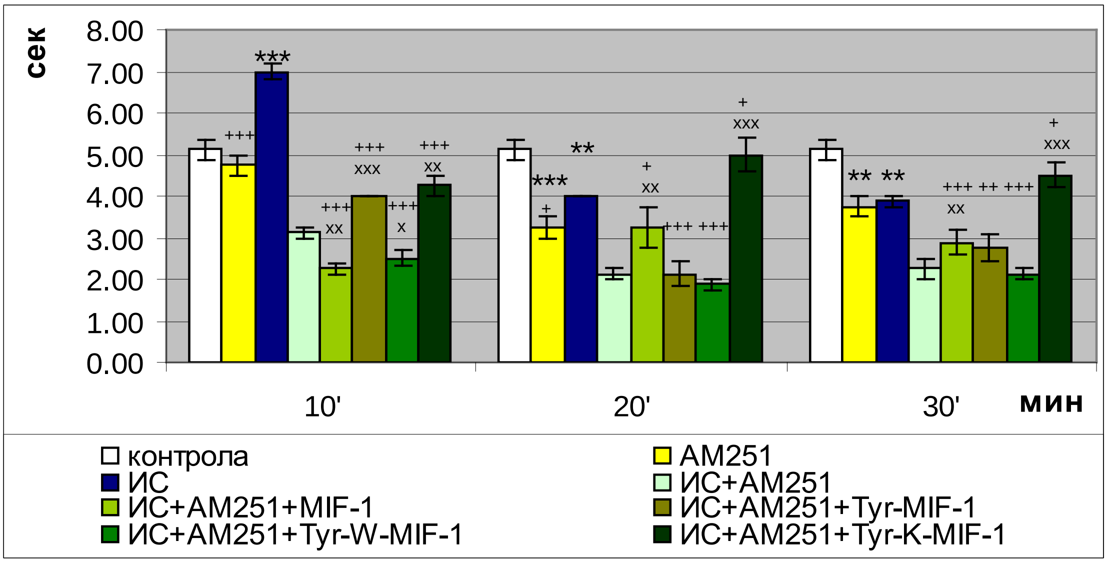
Животните, инжектирани с AM251, показаха по-висок статистически достоверен болков праг (p<0.001) в сравнение с контролите на 10-та и 20-та мин. от изследването (Фиг. 3, 7, 11, 15).

HP-латентността при животните с AM251 показа на 10-та мин. 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+AM251.*

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

НР-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 НР-латентността след имобилизационен стрес.

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

Термичният тест показа съизмерими НР-латентности при животните с анандамид след студов стрес и контролните стойности на 10-та и 20-та мин. На 30-та мин. НР-латентността при животните с анандамид след едночасов студов стрес бе статистически достоверно скъсена ($p<0.001$) както в сравнение с контролните животни, така и след едночасов студов стрес (Фиг. 6, 14).

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

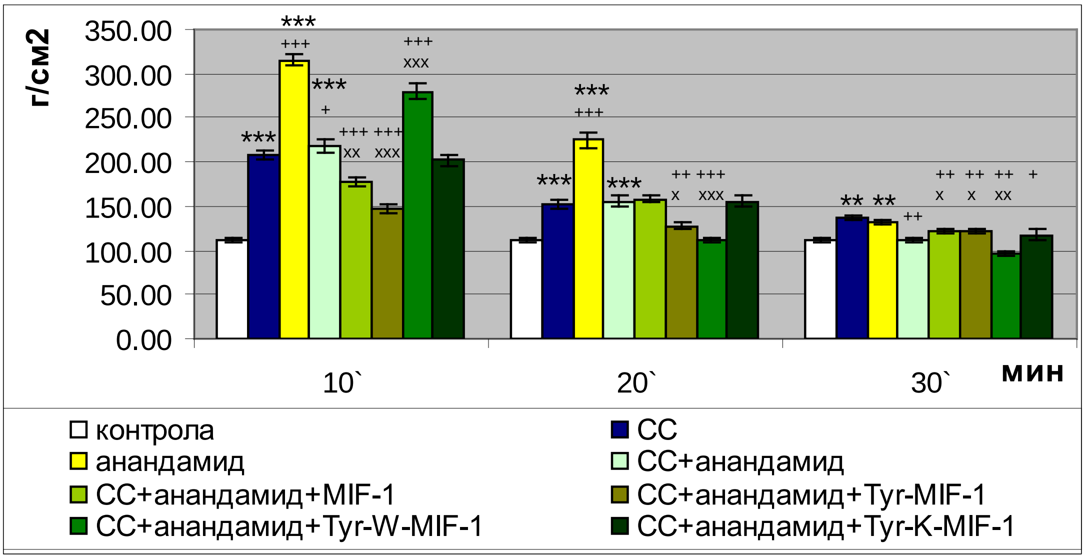
Получените резултати могат да се обяснят с различното участие на опиоидната и неопиоидната компоненти на СИА при различните видове стрес. При студовата стрес-индуцирана аналгезия преобладава неопиоидната компонента (Pacák and Palkovits, 2001; Lapo et al., 2003).

Следователно, ЕКС има по-голямо участие при студовата стрес-индуцирана аналгезия. С този факт би могъл да се обясни повишеният болков праг спрямо този при студовия стрес на 10-та и 20-та мин. от изследването. Едва на 30-та мин. се наблюдава тенденция към понижение на болковия праг. Това би могло да се дължи на потенциране на инхибиторния тоничен ефект на CB1- рецепторите от въведения екзогенно агонист.

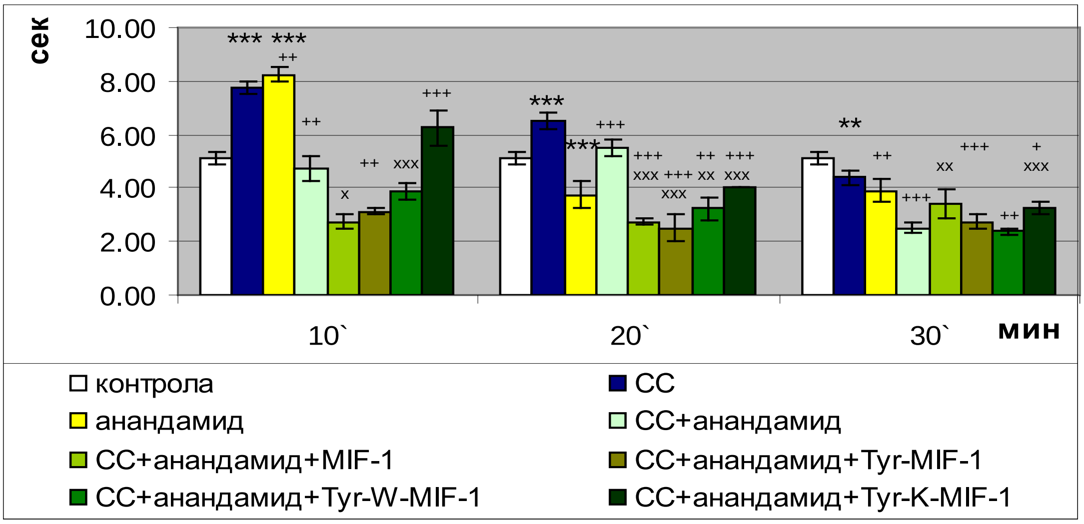
При термичния тест се наблюдаваше намаляване на НР-латентноста за целия период на изследването.

Известно е, че пътищата на провеждане на болковата сетивността при механичния и термичния тест са различни, с което би могло да се обяснят и разликите в резултатите.

Значение има и фактът, че активирането на CB1-рецепторите върху пресинаптичните окончания на първичните аферентни неврони инхибира освобождаването на субстанция Р и глутамат (Pertwee, 2005; Hohmann and Suplita, 2006).




**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 PP 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 CC; xxx p>0.001, xx p>0.01 спрямо CC+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 HP 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 CC; xxx p>0.001, xx p>0.01, x p>0.05 спрямо CC+анандамид.*

Известно е, че AM251 е антагонист и притежава качества и на обратен агонист на CB1-рецепторите. Чрез тях той активира аденилатциклазата, увеличава потока през калциевите и намалява този през калиевите канали (Vasquez et al., 2003; Steffens et al., 2004).

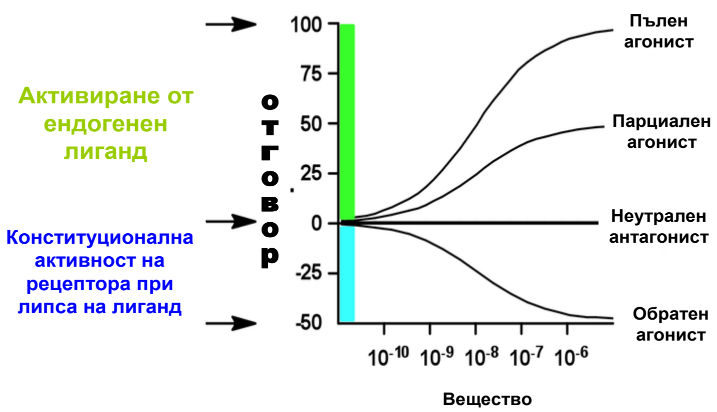
Всичко това дава основание на някои автори да предположат, че в качеството си на обратен агонист на CB1-рецепторите AM251 предизвиква освобождаване на SP, глутамат, а може би и на азотен оксид.

При РР-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 интактни животни и след едночасов имобилизационен стрес за целия период на изследването (Фиг. 4, 12).

Получените от нас резултати показват, че АМ251 понижава болковия праг и скъсява HP-латентността след имобилизационен стрес, което е в подкрепа на литературните данни.

При РР-теста АМ251 е антагонист на CB1- рецепторите, докато при HP-теста той оказва ефект, характерен за обратен агонист на CB1-рецепторите (наблюдава се тенденция към хипералгезия), т.е. АМ251 е едновременно и антагонист, и обратен агонист на CB1-рецепторите, което се вижда от представената графика.

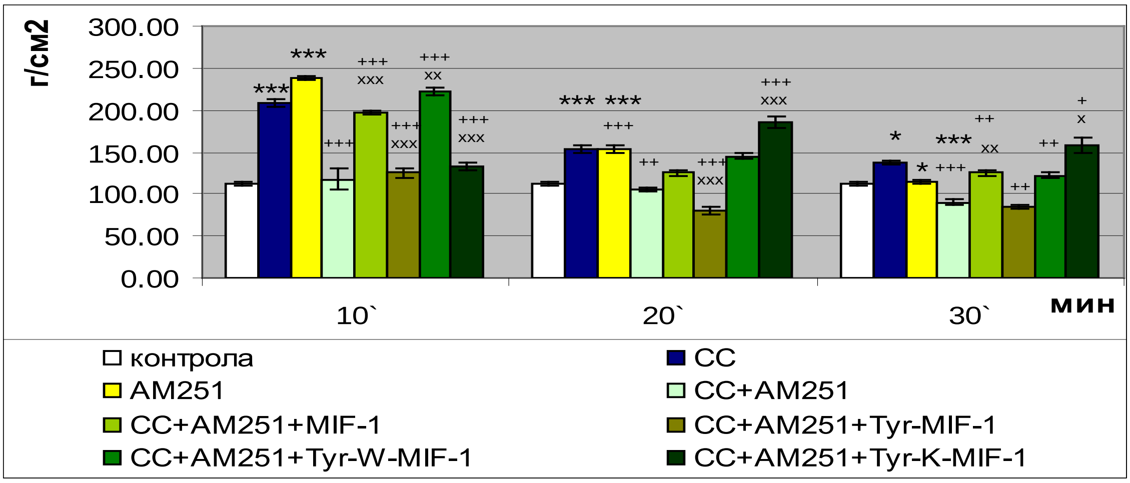



**Графика1**. *Представяне действието на пълен агонист, частичен агонист,неутрален антагонист и парциален агонист на даден рецептор.*

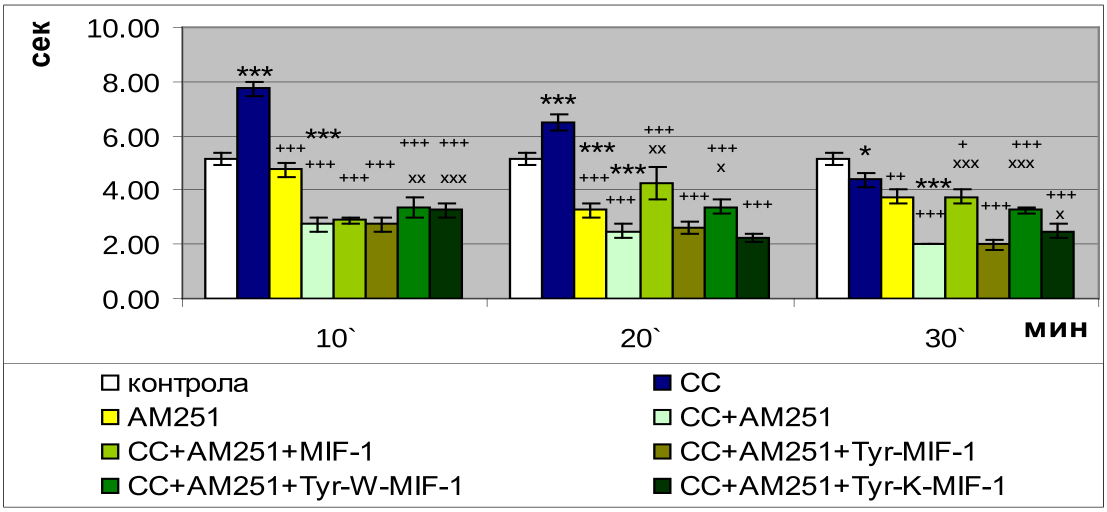
При РР-теста при въвеждането на АМ251 след студов стрес се наблюдаваше статистически достоверно ($p<0.001$) по-нисък болков праг за целия период на изследването в сравнение с този на студовия стрес, като прагът бе съизмерим с този на контролите (Фиг. 7, 15).

При термичния тест HP-латентността при въвеждането на АМ251 след студов стрес 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 Tyr-K-MIF-1) и ендоканабиноидната система върху стрес-индуцираната аналгезия

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).

PP-тестът показа, че при MIF-1, въведен след ИС+анандамид, болковият праг е равен на този на контролните стойности и е статистически достоверно ($p<0.001$) по-нисък от този при ИС за целия период на изследването, както и от стойности за ИС+анандамид на 10-та и 20-та мин. Въведен след ИС+анандамид Tyr-MIF-1 доведе на 10-та мин. до съизмерим болков праг 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 бяха измерените болкови прагове след 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 за всичките пептиди след ИС+анандамид бяха статистически достоверно ($p<0.001$) по-ниски от тези след ИС, но по-високи от 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 при 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 HP-латентността в сравнение с тези на имобилизационния стрес.

MIF-1, въведен след ИС+анандамид, понижи болковия праг и HP-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.

При PP-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 на 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 HP-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 HP-латентността. Всички стойности бяха статистически достоверно ($p<0.001$) скъсени спрямо ИС (Фиг.4). На 20-та мин. от изследването HP-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 HP-латентност в сравнение с ИС+AM251, като стойността на HP-латентността след Tyr-K-MIF-1 статистически достоверно ($p<0.001$) бе удължена и след ИС (Фиг. 4). На 30-та мин. от изследването HP-латентността след MIF-1 и Tyr-MIF-1, въведени след ИС+AM251, бе статистически достоверно ($p<0.01$) удължена в сравнение с ИС+AM251, а статистически достоверно ($p<0.01$) скъсена спрямо ИС. HP-латентността след Tyr-W-MIF-1, въведен след ИС+AM251, бе съизмерима с тази след ИС+AM251, но статистически достоверно ($p<0.001$) скъсена спрямо ИС. HP-латентността след Tyr-K-MIF-1, въведен след ИС+AM251, бе статистически достоверно ($p<0.001$) удължена както спрямо ИС, така и спрямо ИС+AM251 (Фиг. 4).

Следователно, въведени съвместно с AM251, пептидите MIF-1, Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1 понижиха болковия праг и HP-латентността в различна степен за изследвания период в сравнение с имобилизационния стрес.

Въведени съвместно с AM251, четирите пептида удължиха болковия праг и HP-латентността в различна степен за изследвания период в сравнение с имобилизационен стрес+AM251.

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 този на 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.

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 прагът 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 СС+анандамид, бе статистически достоверно ($p<0.001$) скъсена спрямо контролите без стрес, спрямо СС и спрямо СС+анандамид. Tyr-K-MIF-1, въведен след СС+анандамид, показа на 10-та мин. скъсена

НР-латентност в сравнение със СС, но удължена спрямо контролите без стрес и след СС+анандамид (Фиг. 6).

На 20-та и 30-та мин НР-латентостта и за четирите пептида, въведени след СС+анандамид, бе статистически достоверно ($p<0.001$) скъсена спрямо контролите без стрес и след СС. По отношение на животните след СС+анандамид MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след СС+анандамид, показаха тенденция към понижена НР-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 НР-латентността в различна степен за изследвания период от време в сравнение със студовия стрес и студов стрес+анандамид.

Болковият праг на MIF-1, въведен след СС+АМ251, бе съизмерим с този на студовия стрес на 10-та мин., а на Tyr-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след СС+АМ251, бяха по-ниски. Болковият праг за Tyr-W-MIF-1, въведен след СС+АМ251, показа тенденция към повишение в сравнение със този на СС (Фиг. 7).

През останалия период на изследването праговете на MIF-1, Tyr-MIF-1 и Tyr-W-MIF-1, въведени след СС+АМ251, бяха по-ниски в сравнение с този на СС. Болковият праг на Tyr-K-MIF-1, въведен след СС+АМ251, остана по-висок в сравнение с този на СС (Фиг. 7).

Болковият праг на 10-та мин. от изследването за Tyr-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след СС+АМ251, остана съизмерим с този след СС+АМ251, докато за MIF-1 и Tyr-W-MIF-1, въведени след СС+АМ251, се наблюдаваше статистически достоверно ($p<0.001$) по-висок болков праг в сравнение с този на СС+АМ251 (Фиг. 7).

През останалия период от изследването болковият праг на MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени след СС+АМ251, бе статистически достоверно ($p<0.001$) по-висок от този след СС+АМ251. Болковият праг след Tyr-MIF-1, въведен след СС+АМ251, бе по-нисък от този след СС+АМ251(Фиг. 7).

При термичния тест се наблюдаваше скъсяване на НР-латентността за четирите пептида, въведен след СС+АМ251, статистически достоверно ($p<0.001$) 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 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 тази на СС+АМ25 (Фиг. 8).

Получените резултати показаха, че MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, въведени съвместно с AM251, повишиха болковия праг и удължиха HP-латентността в различна степен за изследвания период в сравнение със студовия стрес+AM251.

Tyr-K-MIF-1, въведен съвместно с AM251, повиши болковия праг, но скъси HP-латентността в сравнение със студовия стрес**.**

## IV. Изучаване ефектите на анандамид и AM251 с 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 опиоидергичнаа система при стрес-индуцираната аналгезия при взаимодействието на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 с анандамид или AM251, бе въвеждан несективният антагонист на опиоидните рецептори налоксон.

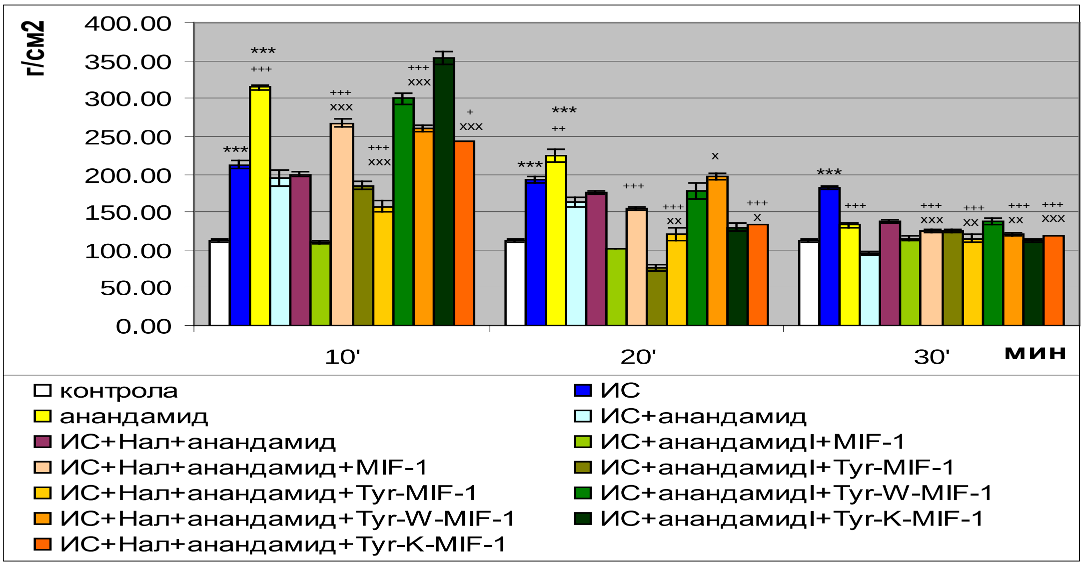
Механичният тест показа, че третирането с налоксон и въвеждането на анандамид не промени статистически достоверно болковия праг на 10-та и 20-та мин. от изследването, докато на 30-та мин. се наблюдаваше статистически достоверно ($p<0.001$) по-висок болков праг в сравнение с този след ИС+анандамид (Фиг.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

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

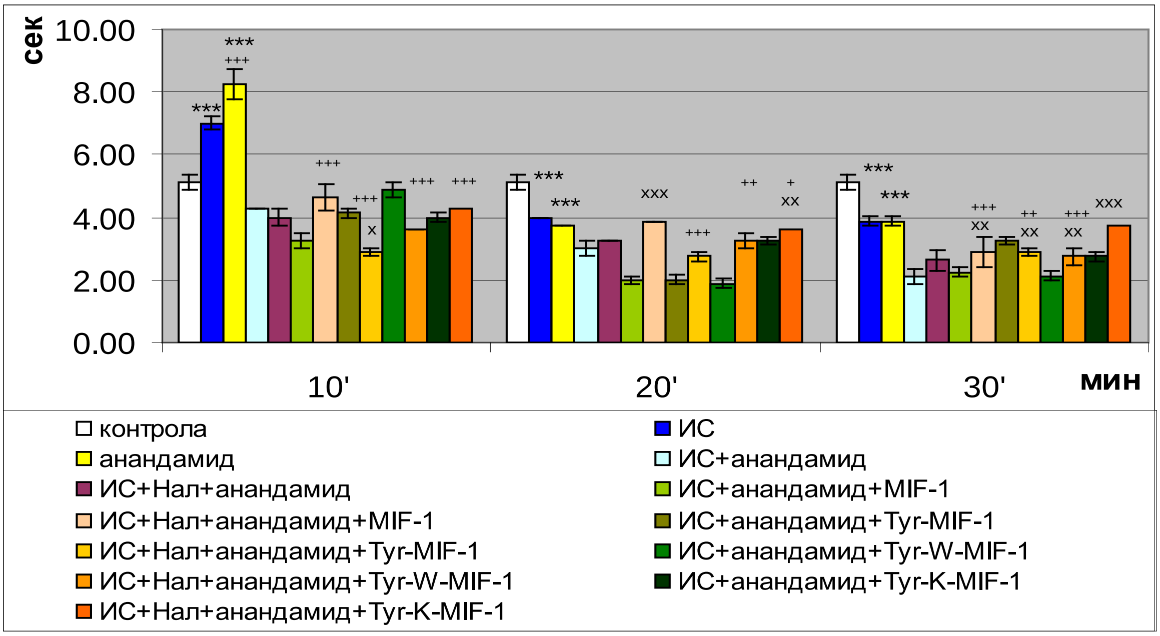
На 10-та мин. от изследването стрес+налоксон+анандамид+Tyr-W-MIF-1 и стрес+налоксон+анандамид+Tyr-K-MIF-1 показаха статистически достоверно ($p<0.001$) по-нисък болков праг в сравнение с този на животните след ИС без налоксон (Фиг.9). На 20-та мин. от изследването болковият праг при стрес+налоксон+анандамид+Tyr-W-MIF-1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



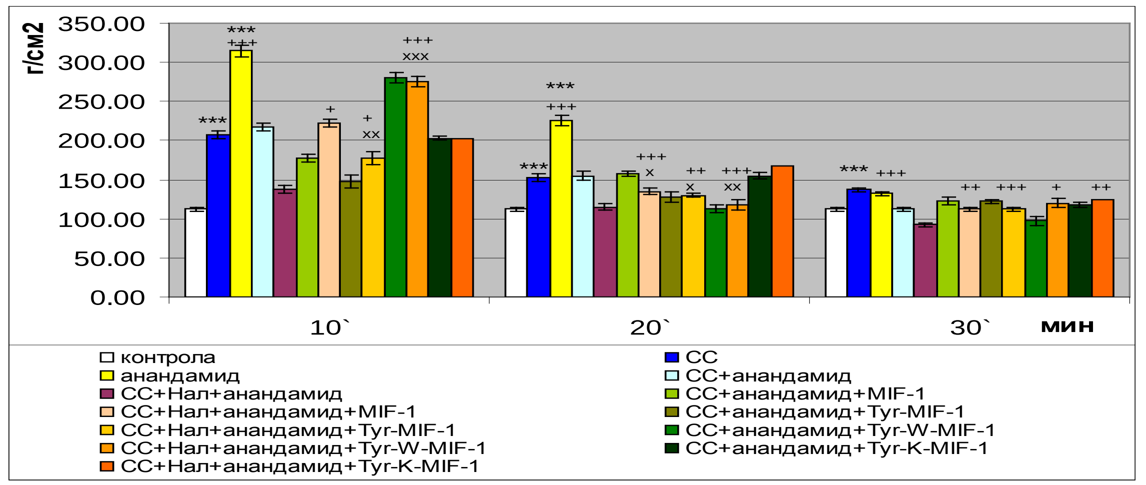

**Фиг. 10.** *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг, i.p.) и анандамид (доза 1 мг/кг, i.p.) върху имобилизационна стрес-индуцирана аналгезия при претретирани с налоксон (доза 1 мг/кг) животни при HP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001 спрямо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

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 СС+анандамид+MIF-1, СС+анандамид+Tyr-MIF-1 и СС+анандамид+Tyr-K-MIF-1, докато групата със СС+анандамид+Tyr-W-MIF-1 показа статистически достоверно (p<0.001) по-висок болков праг на 10-та мин. от изследването (Фиг. 11).

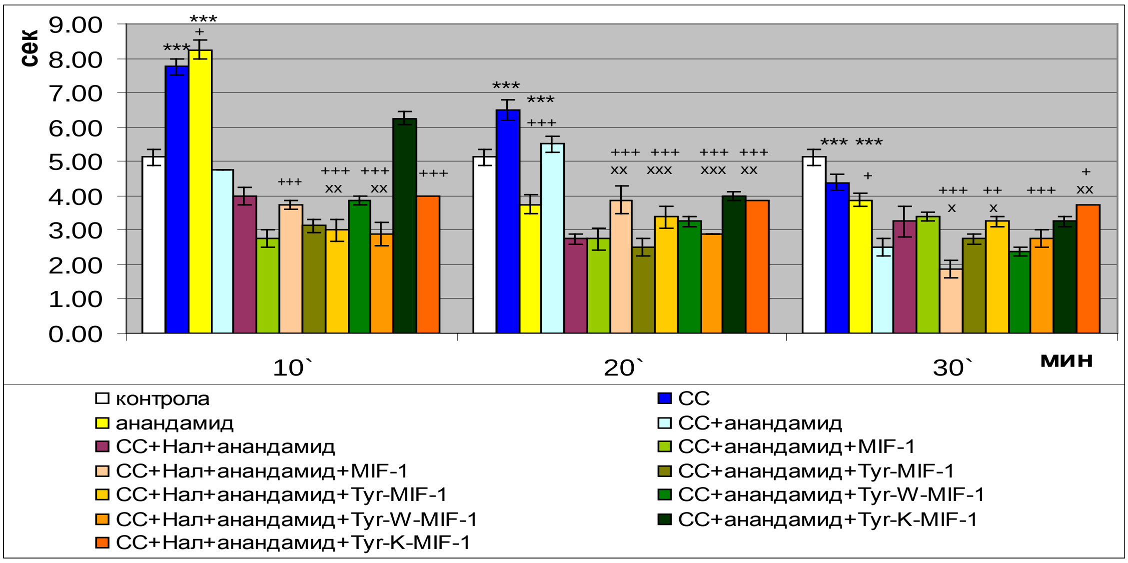
Болковият праг бе повишен след СС+анандамид+MIF-1 и СС+анандамид+Tyr-MIF-1 при третиране с налоксон. Болковият праг остана съизмерим с този без налоксон при СС+налоксон+анандамид+Tyr-W-MIF-1 и СС+налоксон+анандамид+Tyr-K-MIF-1(Фиг. 11). На 20-та мин. от изследването болковите прагове след СС+ налоксон+анандамид+пептид 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. 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 НР-латентността при животните с налоксон в сравнение със тази на СС. По отношение едночасов СС+налоксон+анандамид без пептид на 10-та мин. бе отчетено статистически достоверно ($p<0.01$) скъсяване в групите със СС+налоксон+анандамид+Tyr-MIF-1 и СС+налоксон+анандамид+Tyr-W-MIF-1, докато при СС+налоксон+анандамид+MIF-1 и СС+налоксон+анандамид+Tyr-К-MIF-1 НР-латентностите бяха съизмерими с тези след СС+налоксон+анандамид без пептид (Фиг. 12). На 20-та мин. след СС+анандамид+MIF-1 се наблюдаваше удължаване на НР-латентността и скъсяването й след СС+анандамид+Tyr-W-MIF-1 и СС+анандамид+Tyr-К-MIF-1. След СС+анандамид+Tyr-MIF-1 не се наблюдаваше промяна на НР-латентността (Фиг. 12). На 30-та мин. животните след СС+анандамид+MIF-1 показаха статистически достоверно ($p<0.5$) скъсена НР-латентност спрямо тези без пептид, докато останалите три пептида след СС+налоксон+анандамид показаха НР-латентности, съизмерими с тази на групата без пептид (Фиг. 12).

Получените резултати показаха, че въвеждането на налоксон преди анандамид и 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 РР 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; xx p>0.01, x p>0.05 спрямо СС+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.*

Механичният тест показа, че третираните с налоксон животни след едночасова имобилизация и въвеждане на АМ251 без пептид не води до статистически достоверна промяна на болковия праг в сравнение с групата без налоксон, подложена на имобилизация+АМ251. 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+АМ251 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+АМ251 бяха съизмерими с този след имобилизация+налоксон+АМ251 (Фиг.13). Болковите прагове при MIF-1, Tyr-W-MIF1 и Tyr-K-MIF-1 след имобилизация+налоксон+АМ251 показаха аналогични стойности до края на изследвания период, докато при Tyr-MIF-1 след имобилизация+налоксон+АМ251 на 20-та и 30-та мин. бяха отчетени статистически достоверни ($p<0.01$) по-ниски болкови прагове (Фиг. 13). В сравнение с животните след ИС+АМ251+пептид при въвеждането на налоксон бяха измерени по-ниски болкови прагове за целия период на изследването (Фиг. 13).

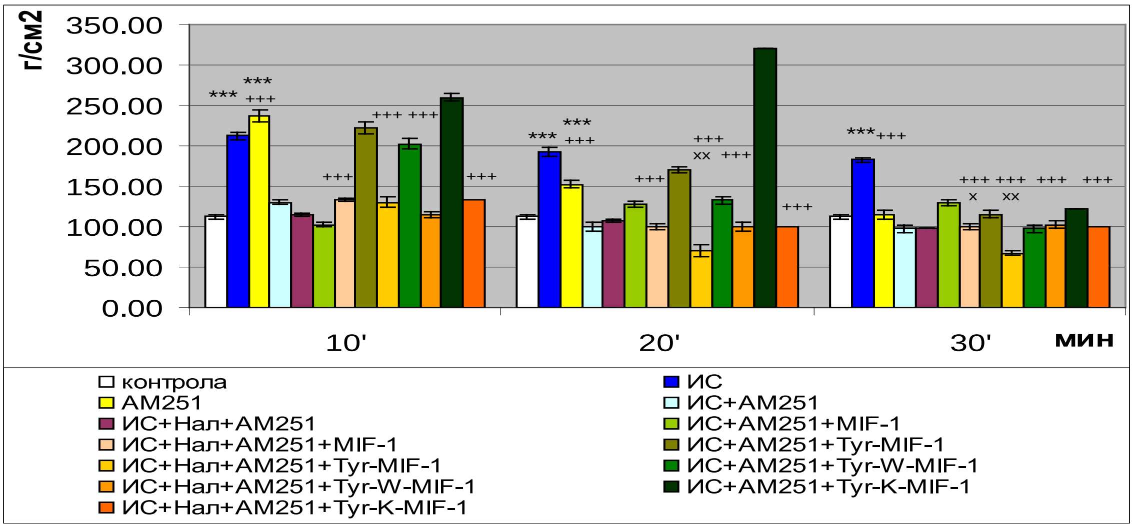
При термичния тест се наблюдаваше статистически достоверно ($p<0.001$) скъсяване на HP-латентността и за четирите пептида, въведени у третирани с налоксон животни след едночасов ИС+АМ251 спрямо стойностите за ИС на 10-та мин. На 20-та мин. се наблюдаваше статистически достоверно удължаване ($p<0.01$) на НР-латентността при MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 след имобилизация+налоксон+АМ251. НР-латентността за Tyr-W-MIF-1 след имобилизация+налоксон+АМ251 бе съизмерима с тази след ИС. Тенденцията се запази и на 30-та мин. от изследването (Фиг. 14). Tyr-MIF-1 след имобилизация+налоксон+АМ251 показа през целия изследван период статистически достоверно ($p<0.001$) скъсяване на НР-латентността спрямо животните след ИС (Фиг. 14).

Третирането с налоксон на животни след едночасов ИС+АМ251 без пептид показа през целия период на изследването аналогични резултати както при РР-теста (Фиг. 14).

НР-латентността за MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 след имобилизация+налоксон+АМ251 на 20-та и 30-та мин., а за Tyr-MIF-1 след имобилизация+налоксон+АМ251 на 30-та мин. бе статистически достоверно удължена спрямо животните без пептид ± налоксон (Фиг. 14).

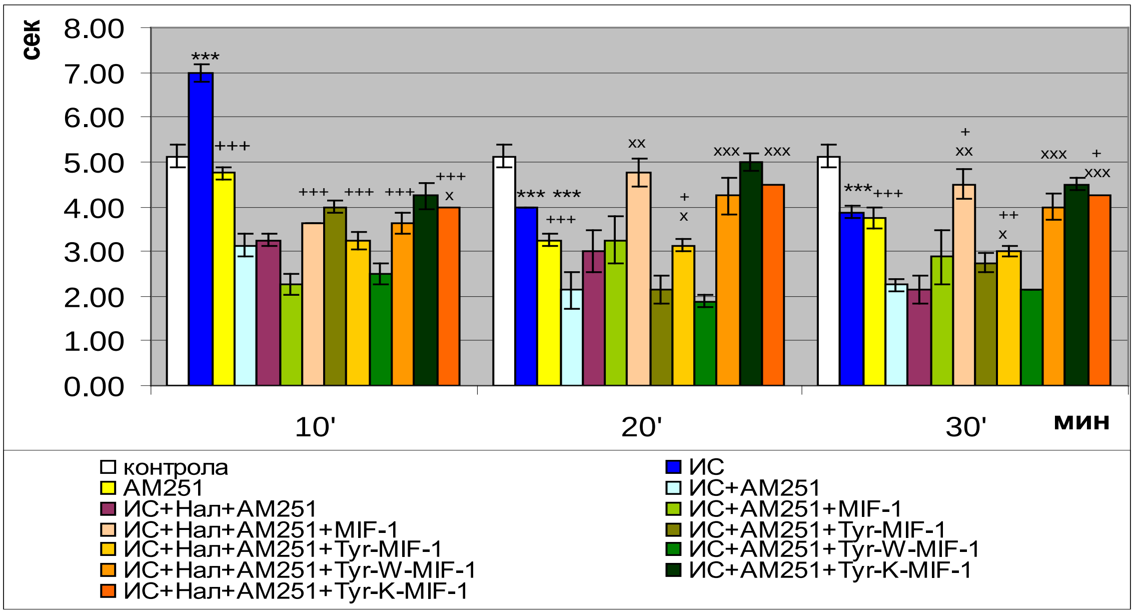
В сравнение с животните без налоксон, въвеждането му показа удължаване на НР-латентността при MIF-1 и Tyr-W-MIF-1 след имобилизация+налоксон+АМ251 за целия период на изследването и скъсяване на НР-латентността за Tyr-K-MIF-1 след имобилизация+налоксон+АМ251 през целия период, а за Tyr-MIF-1 след имобилизация+налоксон+АМ251 на 10-та и 20-та мин. от изследването (Фиг. 14).

Следователно, налоксонът понижава болковия праг и скъсява НР-латентността при съвместното въвеждане на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 и АМ251 след имобилизационен стрес.




**Фиг. 13** *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг i.p.) и АМ251 (доза 1,25 мг/кг, i.p.) върху имобилиьационна стрес-индуцирана аналгезия при РР 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.*

Механичният тест показа, че третираните с налоксон животни след едночасов студов стрес+AM251 понижи статистически достоверно (p<0.001) болковия праг в сравнение с тези на 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).



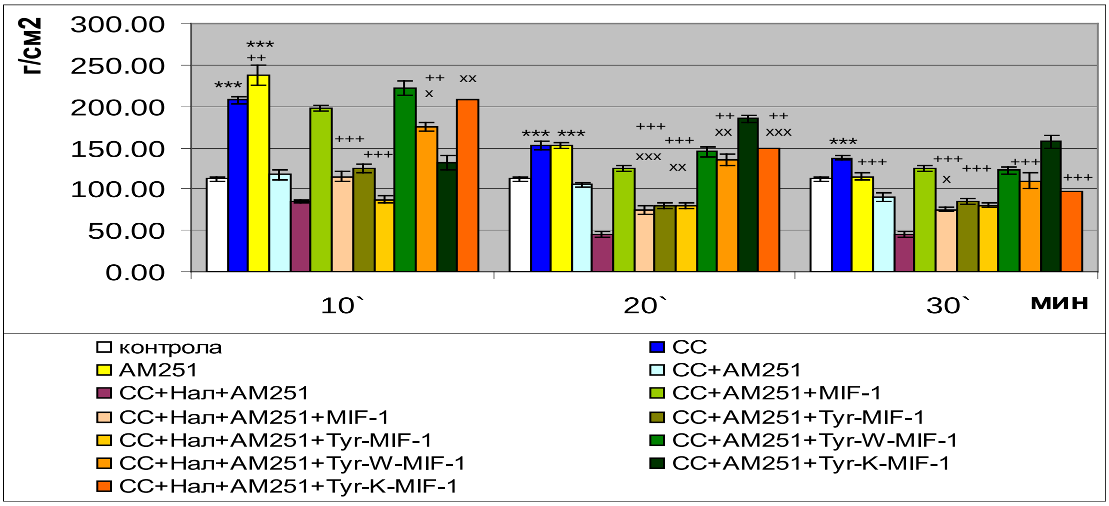

**Фиг. 14** *Ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 (доза 1 мг/кг, i.p.) и AM251 (доза 1,25 мг/кг, i.p.) върху имобилиьационна стрес-индуцирана аналгезия при HP тест. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M. *** p>0.001 спрямо контролата; +++ p>0.001, ++ p>0.01, + p>0.05 спрямо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

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 за Tyr-MIF-1 на 20-та и 30-та мин. (Фиг. 15). 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).

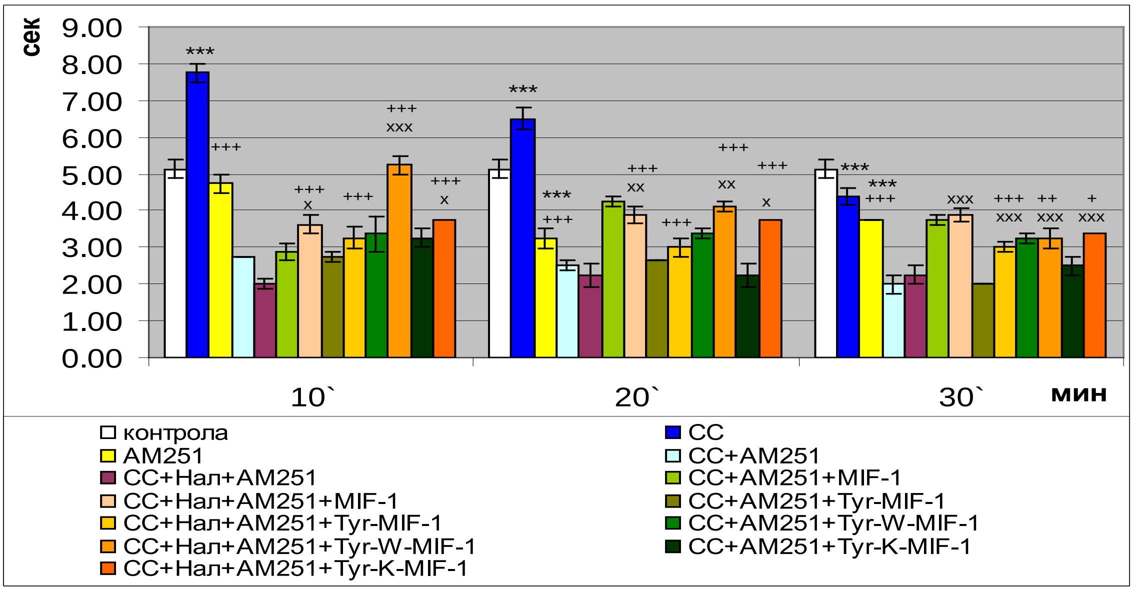
В сравнение с животните без налоксон въвеждането му понижи болковия праг за MIF-1 и Tyr-W-MIF-1 след СС+AM251 за целия период на изследването. За Tyr-K-MIF-1 след СС+AM251 на 20-та и 30-та мин. от изследването се наблюдаваше понижение на болковия праг (Фиг. 15).

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+AM251 след студов стрес, като ефектът бе по-късен и по-слабо изразен в сравнение с този след стрес, 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 СС; xx p>0.01, x p>0.05 спрямо СС+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 СС; xxx p>0.001, xx p>0.01, x p>0.05 спрямо СС+AM251.*

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

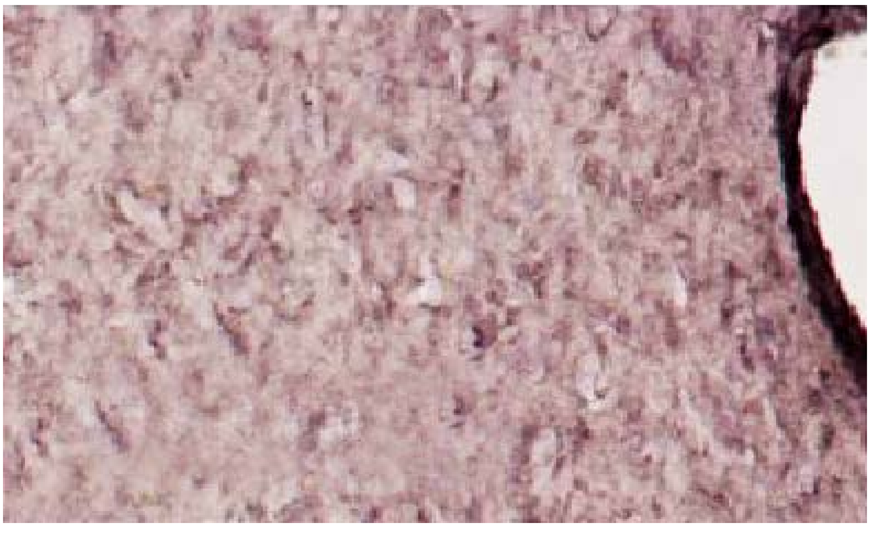
Стимулирането на опиоидните рецептори в PAG активира низходящите пътища, потискащи ноцицепцията (Moreira et al., 2009).

Имуннохистохимични 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).

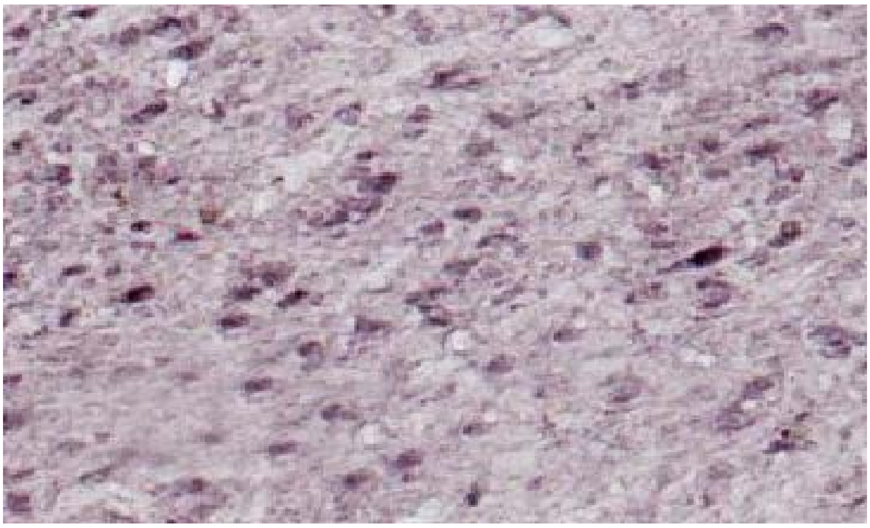
Благодарение на синергизма между опиоиди и канабиноиди може да се предположи, че съществува взаимодействие между тези две системи (Courtwright, 2001).

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.

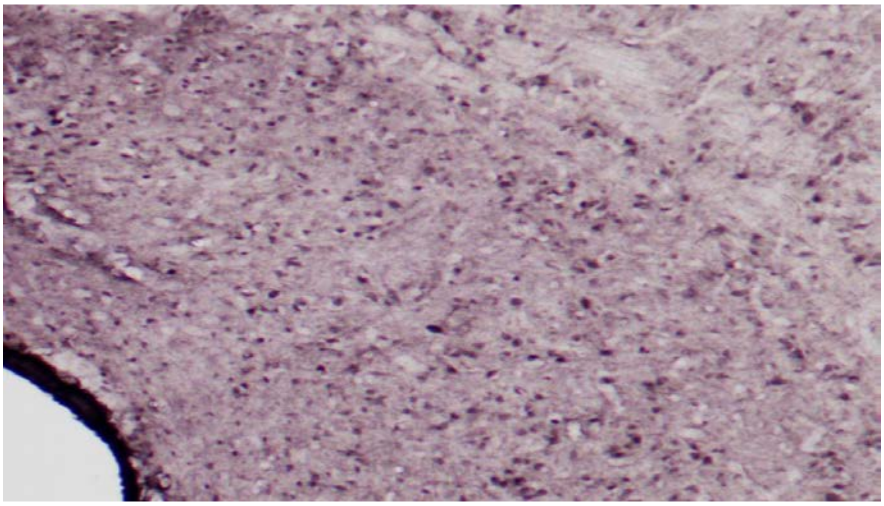
Нашите резултати показаха, че едночасовият имобилизационен и студов стрес повишиха експресията на CB1-имунореактивните неврони в PAG в сравнение с контролите без стрес (Фиг. 17, 18 и 19).



**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).*



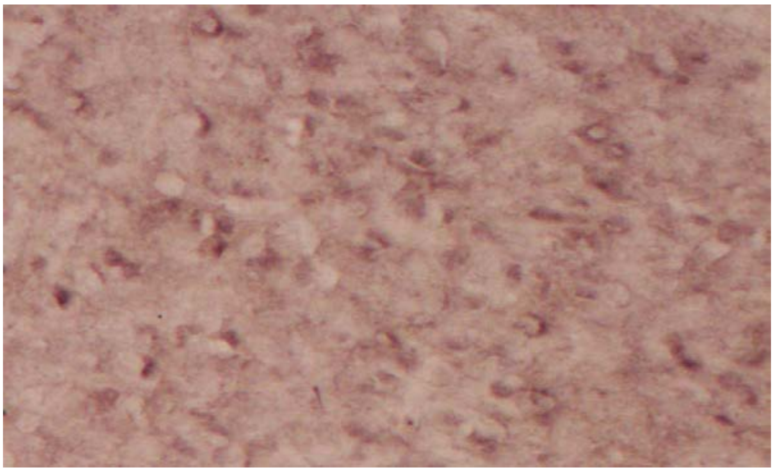
**Фиг. 19.** *CB1-имунореактивни неврони в periaqueductal grey на животни след едночасов студов стрес (x200).*

Известно е, че съществуват количествените разлики в експресията на CB1-рецепторите в условия на имобилизационен и студов стрес.

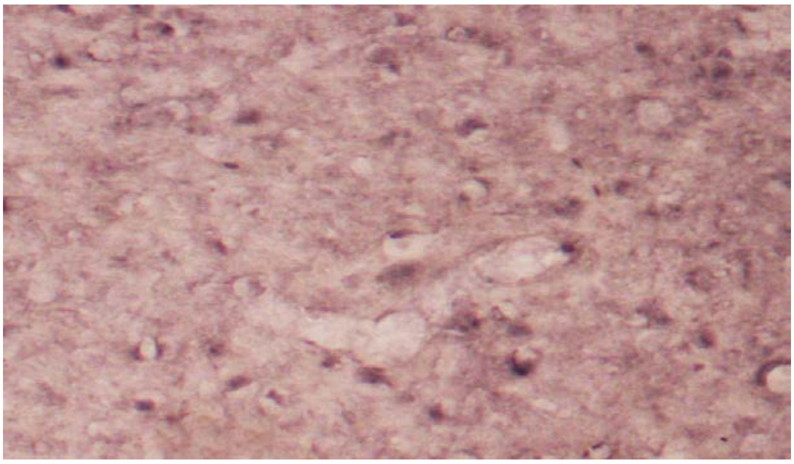
До този момент ***в достъпната ни литература не намерихме данни*** относно ефектите на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху експресията на CB1-рецепторите.

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

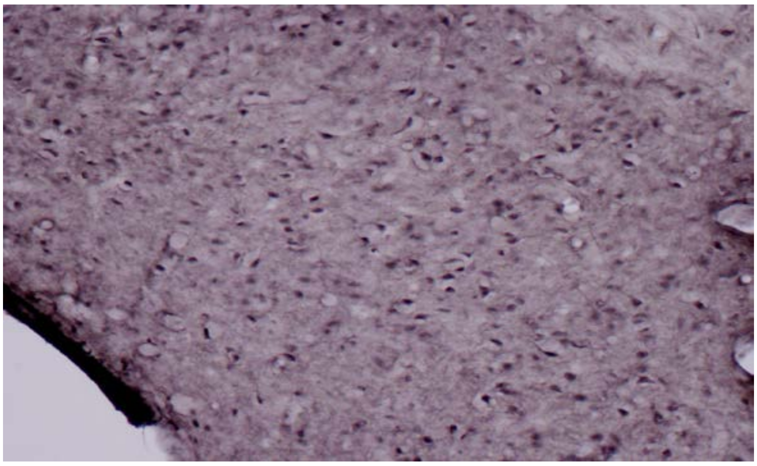
Получените от нас резултати показаха, че изследваните пептиди понижиха експресията на CB-имунореактивните неврони в PAG след едночасов имобилизационен и студов стрес в различна степен (Фиг. 20-23).



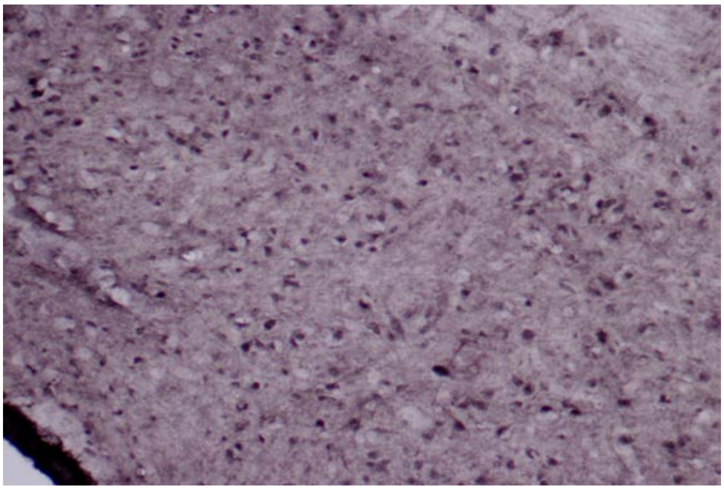
**Фиг. 20.** *Понижение на CB1-имунореактивните неврони в periaqueductal grey под влиянеие на MIF-1 след едночасов имобилизационен стрес (x40).*



**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).*

## 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). Той може да способства директно или индиректно за развитие или обостряне на редица патологични състояния, както и да стане причина за повишаване риска от дадено заболявания. Ето защо стресът има 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 има специфични мозъчни области, които 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 стресогенните фактори (имобилизация, висока, ниска температура и др.) могат да модулират ендогенната опиоидна система (Pacák and Palkovits, 2001).

В условия на стрес се наблюдава понижаване на усета за болка и този феномен е 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).

Ендогенната опиоидна и канабиноидна системи, наред с адренергичната, серотонинергичната, азотноокисната и други са сред основните участващи в антистрес-отговора и способстващи за възстановяване на нарушената хомеостазата (Riedel, 2000).

Наред с тях интерес представляват и пептидите/невромодулаторите в ЦНС. Ето защо е важно изясняване участието и взаимодействията им при 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 не достатъчно изучени.

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

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

Имунохистохимично бяха изследвани мозъчни срезове от *periaqueductal gray* - мозъчна област, участваща 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 **AM251**, i.p.) бяха избрани след направени доза-отговор криви. Пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 бяха въвеждани в доза 1 мг/кг, i.p.

Резултатите от нашето изследване показаха, че едночасовият имобилизационен и 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).

Доказано е, че антиноцицепцията, предизвикана от имобилизационен стрес, се потенцира от опиоиди, което и 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 той повишава 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.

При PP-теста след въвеждане на CB1-антагониста AM251 при интактни животни болковияt праг бе повишен в сравнение с контролите, а при HP-теста се наблюдаваше намаляване 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 за целия период на изследване, което е в подкрепа на преобладаващото схващане за AM251, че той е антагонист/обратен агонист на CB1-рецепторите (Rinaldi-Carmona, 1994; Katsuyama et al., 2010).

Полученият резултат би могъл да се обясни, ако приемем, че AM251 действа и като *парциален агонист на CB1-рецептора*, за което до този момент ние не намерихме литературни данни.

Друго възможно обяснение на резултатите е свързано с описания в литературата постоянен базален инхибиторен тонус на CB1-рецепторите върху базалното ниво на ХХН ос и респективно нивата на ГКС в организма (Finn, 2010). Екзогенно въведеният AM251, намалявайки тоничната инхибиция на ХХН ос повишава нивата на ГКС, което предизвиква временното повишаване на болковия праг.

Въвеждането на анандамид след едночасов ИС намали СИА и при двата теста, докато въведен след студов стрес, анандамидът повиши болковия праг и намали HP-латентността.

Известно е, че острият стрес предизвиква освобождаване на кортокотропин-освобождаващ фактор (КОФ) от паравентрикуларното ядро на хипоталамуса, което повишава секрецията на адренокортикотропен хормон (АКТХ) от аденохипофизата, след което постъпва в системното кръвообращение и индуцира синтеза и освобождаването 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 са изследвали 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 с 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).

Литературните данни са в подкрепа на становището, че базалното ниво на ХХН ос е под тоничния инхибиторен контрол от страна на CB1-рецепторите, т.е. от ендоканабиноидите.

Съществуват доказателства, че острият имобилизационен стрес предизвиква значително намаляване на нивото на анандамид в амигдалата и хипокампа на мишки (Patel et al., 2004, 2005b; Gorzalka et al., 2008). Авторите подчертават, че стрес-индуцираното повишение на кортикостероидите предизвиква потискането 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 потиска СИА.

Както вече бе отбелязано стрес-индуцираната аналгезия се състои от опиоидна и неопиоидна компоненти, различно застъпени при различните видове стрес (Pacák and Palkovits, 2001; Lapo et al., 2003). 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 да обясним ефекта на анандамида при НР-теста след двата вида стрес направихме следната таблица с процентното понижаване на СИА:

| | 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 |

Прави впечатление, че анандамидът понижава СИА по-силно след имобилизационния стрес на 20-та минута. Този ефект би могъл да се обясни с постоянния базален инхибиторен тонус на CB1-рецепторите върху базалното ниво на ХХН ос, 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 при HP-теста се наблюдава потискане на СИА.

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. Ефектът на анандамида е *U*-образен.

Получените чрез PP-теста резултати след въвеждане на анандамид след 1час 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 и обуславя потенцирането ѝ след въвеждане на CB1- рецепторен агонист.

Въвеждането на антагониста на CB1-рецепторите AM251 понижи СИА при двата вида стрес и при двата използвани теста. Доказано е, че активирането на CB1-рецепторите върху пресинаптичните окончания на първичните аферентни неврони инхибира освобождаването на субстанция Р (SP) и  глутамат, което е в основата на посочения ефект (Pertwee, 2005; Hohmann and Suplita, 2006).

Литературните данни показват, че AM251 притежава качества на антагонист и на обратен агонист на CB1-рецепторите, чрез които 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, глутамат и азотен оксид (NO). Приема се, 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 хипералгезия (Kitto et al., 1992; Meller and Gebhart, 1993).

Получените от нас резултати са в подкрепа на литературните данни относно потискащото действие на AM251 върху аналгезията (Steffens et al., 2004).

Ние обобщихме процентното понижение на имобилизационната и студовата СИА след въвеждане на AM251 в следната таблица:

| | **на 10-та мин.** | | **на 20-та мин.** | | **на 30-та мин.** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **PP** | **HP** | **PP** | **HP** | **PP** | **HP** |
| **% намаление на СИА след 1 ч. имобилизационен стрес +AM251** | 38,8 | 55,7 | 48,0 | 46,7 | 46,5 | 40,7 |
| **% намаление на СИА след 1 ч. 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 по-значително при HP-теста.**

От всичко това следва, че при студовата СИА участието на неопиоидната компонента е по-изразено. Ето защо въвеждането на антагониста/обратен агонист на CB1-рецепторите AM251 оказва по-значително потискане на студовата СИА в сравнение с имобилизационната.

Опиоидните пептиди 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).

Аналгетичните ефекти могат да бъдат обяснении с факта, че рецепторите и на двете групи вещества са съвместо локализирани върху едни и същи неврони. С помощта на *in situ* хибридизационни, авторадиографски и имунохистохимични изследвания е доказано значението на PAG в 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 двата вида рецептори инхибира аденилатциклазата, което от своя страна намалява продукцията и акумулирането на цАМФ (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 et al., 2002).

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 са открити в централната нервна система. Тяхното разпределение и специфичните им места за свързване съвпадат с това на опиоидните рецептори. Те се свързват с опиоидни рецептори, както и със свои специфични места в мозъка. Всеки един от четирите невропептида има опиоидоподобни и антиопиоидни ефекти.

Фамилията е наречена на MIF-1, който е първият пептид изолиран от хипоталамуса и за когото е доказан ефект „нагоре" към мозъка освен „надолу" към хипофизата. MIF-1 антагонизира действието на опиоидните пептиди и е първият описан антиопиоиден пептид (Kastin et al., 1979, 1985). 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 стриатум, хипоталамус и кора 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., 1980, 1979; Yehuda et al., 1980; Galina and Kastin, 1985) и дори човек (Ehrensing et al., 1984). Наблюдавано е обръщане на ефекта както на екзогенните, така и на ендогенните опиоиди.

Tyr-MIF-1 притежава свързващ участък с висок афинитет, насищане и специфичност, но MIF-1 не се конкурира за този участък (Zadina et al., 1982). 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).

Tyr-MIF-1 се характеризира с антиопиоидни ефекти, както и със селективност на свързване към μ-опиоидния рецептор.

MIF-1 и Tyr-MIF-1 притежават антиопиоидни ефекти при *tail-flick*- (Kastin et al., 1979, 1985) и *hot-plate*-теста (Galina and Kastin, 1987, 1988) и инхибират някои форми на СИА (Galina and Kastin 1986, 1987, 1988; Kavaliers and Hirst, 1986). Двата пептида блокират аналгезията, предизвикана от морфин, както и топлинната СИА.

Според някои автори MIF-1 и Tyr-MIF-1 нямат ефект върху неопиоидната компонента при студова стрес-индуцирана аналгезия у плъхове (Kavaliers, 1987; Galina and Kastin, 1988). Аналгетичните ефекти при топлинна СИА са налоксон-зависими, докато при студова стрес-индуцирана аналгезия налоксонът няма ефект (Kavaliers, 1987).

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.

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).

Tyr-W-MIF-1 е 200 пъти по-селективен по отношение на μ- в сравнение с $\kappa$- и $\delta$-опиоидните рецептори (Zadina et al., 1994). Свързващата му активност като цяло е по-ниска в сравнение с класическите опиоиди. Tyr-W-MIF-1 се свързва както с $\mu_1$- така и с $\mu_2$-опиоидни рецептори (Zadina et al., 1996). Пептидът понижава дозо-зависимо индуцираната от морфина обратна регулация на $\mu$- и $\delta$- рецепторите в човешки невробластомни клетки (Harrison et al., 1998) и антагонизира морфиновата аналгезия (Gergen et al., 1996).

Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 се свързват както с опиоидни, така и със свои специфични места в мозъка (Erchegui et al., 1992; Hackler et al., 1993). 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 (Zadina et al., 1996). Опиоидите не се свързват към този участък (Zadina et al., 1990b).

Tyr-W-MIF-1 понижава индуцираната от имобилизационен стрес анти-ноцицепция, 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 $\mu_2$-медииран, докато антиопиоидните ефекти са опосредствани от $\mu_1$-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 опиоиди 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 $\mu M$ (Hackler et al., 1994).

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 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.

Както бе отбелязано вече пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 притежават опиоидни и антиопиоидни ефекти при определени експериментални постановки. Те потискат СИА, предизвикана от имобилизационен, студов или топлинен стрес.

Ето защо за нас представляваше интерес да се изучат ефектите на **всеки един от пептидите на семейството на Tyr- MIF-1** върху ЕКС в условия на имобилизационен и студов 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 с анандамид, показаха по-нисък болков праг и скъсена HP-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. Tyr-MIF-1 при съвместното въвеждане с анандамида показа *U*-образен ефект върху ноцицепцията и при двата теста.

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

Разликите в ефектите на четирите пептида могат да бъдат обяснени и с различното им рецепторно свързване, което бе описано по-горе.

Въвеждане 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+анандамид, Tyr-MIF-1+анандамид и Tyr-W-MIF-1+анандамид проявиха потискащ ефект още на 10-та мин., а Tyr-К-MIF-1 на 20-та мин., от изследването спрямо стойностите на студов стрес+анандамид.

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

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

Засега са идентифицирани два вида канабиноидни рецептори CB1 и CB2. Първите са разположени предимно в ЦНС, а 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 *Δ*9-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 от μ- и CB1-рецепторите, тъй като въведените селективни μ- или CB1-рецепторни антагонисти изцяло са го блокирали (Reche et al., 1996).

Доказано е и потенциращото действие на *Δ*9-ТХК върху ефекта на морфина и кодеина чрез *tail-flick test* (Smith et al., 1998; Cichewicz et al., 1999). Показано е, че ендогенни опиоидни пептиди се отделят след интратекално въвеждане на *Δ*9-ТХК (Pugh et al., 1996). По-късно е доказано, че *Δ*9-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 данни 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 *Δ*9-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 *Δ*9-

ТХК е по-изразен при животни с диабет, в сравнение със здрави контроли (Williams et al., 2008).

Всичко казано до тук налага ревизия на отношението към канабиноидите и приемане, че те играят значима 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, където в развитието на СИА преобладава неопиоидната компонента. Получените резултати се подкрепят косвено от някои литературни данни, при които е показано, че MIF-1 антагонизира СИА вследствие 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 на 20-та мин. и е по-силно изразен след имобилизационен стрес.

Ефектите на Tyr-MIF-1 се медиират от $\mu$- и $\kappa$-опиоидните рецептори, както и от собствени не-опиоидни места. Редица автори показват, че пептидът има ефект при психосоциален стрес-, *foot-shock*-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 както след имобилизационна, така и след студова СИА.

Известно е, че при имобилизационната СИА е по-голямо участието на опиоидната компонента. Опиоидните ефекти на Tyr-W-MIF-1 са $\mu_2$-медиирани, антиопиоидните са предимно $\mu_1$-зависими (Fisher et al., 2006). Наред с опиоидните рецептори той има свързвания и с неопиоидни места. Опиоидното свързване е предимно с $\mu$- (както $\mu_1$, така и $\mu_2$), отколкото с $\delta$- и $\kappa$- 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 различните ефекти при двата вида СИА. По-продължителен ефектът след имобилизацията, който е обусловен от по-силното свързване с $\mu_2$-опиоидните рецептори (Fisher et al., 2006) за разлика от MIF-1 и Tyr-MIF-1, при които подобно свързване не е доказано.

Получените резултати се подкрепят и от опити, в които се съобщава 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, отчетено и по двата метода (PP и HP), като 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, както и на различното участие на μ-рецепторните подтипове в проявата на 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, където 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. Вероятно причината е в свързването на Tyr-W-MIF-1 с $\mu_2$-опиоидните рецептори (Fisher et al., 2006). Получените резултати за Tyr-K-MIF-1 след студов стрес се различават 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). Резултатите от термичният метод са в подкрепа на подобна хипотеза, тъй като и при него се наблюдаваше удължаване на HP-латентността на 10-та мин. в сравнение със студов стрес+анандамид, за разлика от останалите три пептида, при които HP-латентността бе скъсена.

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

Съвместното приложение на MIF-1 и AM251 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 отчетените стойности на HP-латентността след двата вида стрес: на 20-та и 30-та мин. тя бе скъсена спрямо стреса, но удължена спрямо стрес+анандамид. Разликата бе на 10-та мин., когато HP-латентността бе съизмерима с тази след СС+анандамид, но статистически достоверно скъсена спрямо ИС+анандамид.

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 HP-латентност след ИС. Подобна тенденция бе отчетена и след СС на 10-та мин. при механичния тест и на 20-та мин. за термичния.

Получените резултати показват, че MIF-1+AM251 има по-силен потискащ ефект при имобилизационния стрес в сравнение със студовия.

Съвместното приложение на Tyr-MIF-1 и AM251 след стрес показа понижение на болковия праг, по-силно изразено след студовия стрес в сравнение с имобилизационния, както и скъсяване на HP-латентността спрямо стреса, също по-силно изразена след студовия стрес.

При съвместното въвеждане на Tyr-MIF-1 с AM251 след имобилизация се наблюдаваше тенденция към повишаване на болковия праг, а при СС болковия праг бе понижен.

Последни изследвания показват, че AM251 се проявява като директен антагонист и на μ-опиоидните рецептори (Seely et al., 2012). Ако приемем, че антиопиоидният ефект на пептида е поне отчасти μ-медииран, блокирането им 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 потискащият ефект на Tyr-W-MIF-1 е по-изразен при съвместно въвеждане с AM251 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 при съвместното въвеждане на Tyr-W-MIF-1 с AM251 се дължи, от една страна на взаимодействието на опиоидните и неопиоидни ефекти на пептида, а от друга, на различното застъпване на опиоидната и неопиоидната компоненти в развитието на СИА след двата вида стрес. Допълнително усложниние представлява и доказаният ефект на AM251 като директен антагонист на $\mu$-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. Бе наблюдавано повишение на болковия праг и при двата вида стрес. След ИС повишението бе отчетено още на 10-та мин., като на 20-та мин. от изследването бе отчетено допълнително покачване на болковия праг, последвано от намалението 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 30-та мин. от изследването. Повишението на болковия праг бе по-ниско в абсолютни стойности от това при ИС и не бе отчетено при термичния тест.

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, измерено и при двата ноцицептивни теста. След СС аналгетичният ефект се прояви по-късно и не бе отчетен чрез термичния тест.

Посоченият ефект на Tyr-K-MIF-1 вероятно се дължи на свързването му със свое място, към което останалите три пептида не се свързват. Ефектът е по-силно изразен при ИС в сравнение със СС.

Допълнително уточняване 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 HP-латентността през целия период на изследването.

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

Данни за потискащия ефект на налоксона върху канабиноидно-обусловената аналгезия са 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 $\mu$-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 $\mu$ / 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 предизвика значителни промени на болковия праг и HP-латентността.

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

Ефектът от съвместното въвеждане на MIF-1 при ИС в присъствие на агонист на CB1-рецепторите, от една страна, и на налоксон, от друга, доведе до повишение на болковия праг и удължаване на HP-латентността през целия период на изследване, като болковият праг на 10-та мин. бе статистически достоверно по-висок от този за ИС.

Известно е, че 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).

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; бе измерено също и удължаване на HP-латентността на 10-та и 20-та мин. Посочените ефекти на налоксон 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 HP-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-медиираност, 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 HP-латентността спрямо ИС+ AM251, но показа допълнително понижение на прага на болката през целия период спрямо СС+AM251, както и скъсяване на 10-та мин. на HP-латентността спрямо СС+AM251.

След съвместно въвеждане на MIF-1 с налоксон и AM251 след ИС бе отчетено краткотрайно повишение на болковия праг, както и удължаване на HP-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 HP-латентността бе удължена и спрямо ИС, но без да достигне контролните стойности. Подобен ефект не бе наблюдаван след СС.

Описаният краткотраен аналгетичен ефект след въвеждане на MIF-1 след налоксон и анандамид 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 налоксон и AM251 след ИС показа понижение на болковия праг спрямо ИС+AM251 и съответния пептид през целия проследен период, както и скъсяване на HP-латентността 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 налоксон и AM251, спрямо стойностите без налоксон. При СС е застъпена предимно неопиоидната компонента в развитието на СИА, поради което налоксонът не променя 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 и AM251 краткотрайно повиши болковия праг до стойност, съизмерима с тази на СС, от една страна, и на СС+анандамид+пептид, от друга.

Следователно, пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 и ЕКС повлияват СИА след имобилизационен и студов стрес, т. е. те реализират своите антиопиоидни ефекти. Значение има участието на опиоидната и неопиоидната компоненти при СИА, както и взаимодействието между различните рецептори.

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

Както едночасовата имобилизация, така и студовата експозиция повишават КОФ в *nucl. 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. Тя е широко разпространена невромодулаторна 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). 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).

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), т. е. канабиноидите притежават способността да потискат освобождаването на много невротрансмитери/невромодулатори.

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 агониста – 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 анандамид 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.

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).

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. Както вече бе отбелязано, 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).

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

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 азотноокисната 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, 2008 a, b).

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

Сумирайки получените резултати от изследванията може да отбележиме, че те добавят **за първи път нови данни** относно ефектите на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 върху канабиноидната система при имобилизационна и студова стрес-индуцирана аналгезия.

# 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 AM251, 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:

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;

2. Антиопиоидният ефект на MIF-1 съвместно с анандамид е по-силно изразен след имобилизационен стрес в сравнение със студов;

3. 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;

4. 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.

## 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, 3(3), 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, 66(7), 1051-1056. (IF=0.211 ).
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. ( IF=0.211, 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.