

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ**

**Д-р Ана Пенчева Цакова**

**ФАРМАКОЛОГИЧНИ ПОДХОДИ ЗА  
ПОВЛИЯВАНЕ НА БОЛКАТА ПРИ  
РАЗЛИЧНИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ  
МОДЕЛИ. ОСНОВИ ЗА МЕХАНИЗЪМ  
НАСОЧЕНО ЛЕЧЕНИЕ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**София • 2016**

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ**

**Д-р Ана Пенчева Цакова**

**ФАРМАКОЛОГИЧНИ ПОДХОДИ ЗА  
ПОВЛИЯВАНЕ НА БОЛКАТА ПРИ РАЗЛИЧНИ  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ.  
ОСНОВИ ЗА МЕХАНИЗЪМ НА СОЧЕНО  
ЛЕЧЕНИЕ**

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

Направление: 7. Здравеопазване и спорт  
Професионално направление: 7.1. Медицина  
Научна специалност: Фармакология  
(вкл. Фармакокинетика и химиотерапия)

**Научни Ръководители:**

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

**Проф. д-р Славина Кирилова Сурчева, дм**

**Рецензенти**  
**Проф. д-р Ирен Белчева, дм, дмн**  
**Доц. д-р Иван Ламбев, дм**  
**София • 2016**

Дисертационният труд е представен на 153 страници и е онагледен с 41 фигури и с 17 таблици.

Библиографията включва 220 литературни източника, от които 2 на кирилица и 218 на латиница.

**Официалната защита** на дисертационния труд ще се проведе на 26 септември 2016 г. от 16.00 часа, в зала № МФ – София, ул.Здраве № 2, въз основа на Заповед № PR 36-882/25.04.2016 г. на Ректора на МУ – София, пред научно жури в състав:

Проф д-р Ирен Белчева, дм, дмн

Проф.д-р Мила Власковска, дм, дмн

Проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, дмн

Доц.д-р Иван Ламбев, дм

Проф. д-р Славина Сурчева, дм

Резервни членове:

Доц. д-р Мирослава Варадинова, дм

Доц. д-р Галя Ставрева-Маринова, дм

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ – София.

# СЪДЪРЖАНИЕ

<b>I. ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....	9
<b>III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b> .....	12
1. Експериментални животни .....	12
2. <i>In vivo</i> методи .....	12
2.1. Модел на постменопаузална остеопороза .....	12
2.2. Модел на опиоидна толерантност и зависимост .....	13
2.3. <i>In vitro/ ex vivo</i> модел на "дисменорея" .....	15
3. <i>In vitro</i> методи .....	16
3.1. Електрическа и с PGE2 стимулация на изолиран маточен рог .....	16
3.2. Денситометрия само на фибула и тибия .....	16
3.3. ELISA методи за определяне на IL-6 и RANKL .....	16
3.4. Concanavalin A - индуцирана лимфоцитна пролиферация при опиоидна толерантност/зависимост .....	16
3.5. NADPH diaphorase (NO-синтаза) при експериментална опиоидна толерантност/зависимост .....	17
3.6. Апоптоза на тимоцити и ДНК фрагментация .....	17
4. Методи за статистически анализ .....	18
<b>IV. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РЕЗУЛТАТИ</b> .....	19
1. Ефекти на екстракт от <i>Apium</i> и Genistein върху динамиката при изменения съпътстващи експериментална остеопороза .....	19
1.1. Динамични промени на телесната маса.....	19
1.2. Динамични промени на костната минерална плътност (BMD) .....	20
1.3. Динамични промени на костната микроархитектура.....	21

1.4. Динамични промени на серумните нива на IL-6 и RANKL.....	24
1.5. Динамични промени на ноцицептивните прагове при механична болка и периартикуларен едем .....	25
1.6. Ефект на Аналгин (Metamizol) върху инфламаторната болка при експериментална остеопороза .....	26
2. „ <i>In vitro</i> еквивалент“ на спастична висцерална болка при симплифициран хормонално симулиран дисменорея.....	27
3. Нитроксидергична модулация на опиоидната толерантност / зависимост.....	29
3.1. Модулация на поведенческите реакции.....	29
3.1.1. Ефект на L-NAME върху Морфин-индуцираните поведенски реакции .....	29
3.2. NADPH diaphorase активност в стволите ядра на главния мозък.....	32
3.3. Ефект на NOS инхибиция върху развитието на ранен толеранс към някои сърдечно-съдови ефекти на морфин.....	34
4. Concanavalin A-индуцирана лимфоцитна пролиферация.....	35
5. Апоптоза / ДНК фрагментация на тимоцити.....	36
<b>V. ОБОБЩЕНИЕ</b> .....	38
<b>VI. ИЗВОДИ</b> .....	42
<b>VII. ПРИНОСИ</b> .....	44
<b>VIII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b> .....	46
<b>IX. УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b> .....	47
<b>ANNOTATION</b> .....	49

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AA	Арахидонова киселина
АТФ	Аденозинтрифосфат
BMC	Костно минерално съдържание
BMD	Костна минерална плътност
НЛР	Нежелани лекарствени реакции
НСПВС	Нестероидни противовъзпалителни средства
cAMP	Цикличен аденозинмонофосфат
COX	Циклооксигеназа
DEXA	Dual energy X-ray absorbtometry
DPM	Disintegrations per minute
DRN	Dorsal raphe nucleus
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HR	Пулсова честота
HRT	Хормон-заместваща терапия
IL	Интерлевкин
L-Arg-NO	L-аргинин NO (nitric oxide)
LDT	Laterodorsal tegmental nucleus
mGluR	Метаботропни глутаматни рецептори
NADPH- diaphorase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase
NRM	Nucleus raphe magnus
NMDA	N methyl-D-aspartate
NO	Nitric oxide (азотен оксид)
NOS	Азотоксидна синтаза
OVX	Ovariectomized
PAG	Grisea periaqueducti mesencephali
PG	Простагландини
PPN	Pedunculopontine tegmental nucleus
PPT	Paw pressure test
RANK	Рецептор за активиране на нуклеарния фактор NF-κB
RANKL	Ендогенен лиганд на този рецептор
PHT	Plantar heat test
SRT	Спиноретикуларен път
STT	Спиноталамичен път
TNF-α	Тумор-некротизиращ фактор
TXA	Тромбоксани

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Съгласно дефиницията на Международната Асоциация за Изследване на Болката (IASP) „*Болката е неприятно сензорно и емоционално преживяване свързано с реално или потенциално увреждане на тъкани.*“ Болката винаги е субективно изживяване и нейната крайна оценка се определя от мястото и характера на увреждането, от природата на увреждащите фактори, от психичния статус, от възпитанието и житейския опит на индивида.

Разграничаването на остра и хронична болка е свързано с тяхното времетраене. По правило острата болка е симптом на увреждане на тъкани и отзвучава след отстраняване на ноксата или увреждането. Острата болка тригерира рефлексии, които по същество са защитни реакции за избягване от продължаващо алгогенно въздействие и в този смисъл болката може да се приеме като „*пети признак на живота*“ (Campbell, J.N., 2016). Като хронична се определя болка, която продължава по-дълго от нормалното време за оздравяване на увреденият тъкан, което се приема че е в границите на 3 месеца (Mersky, H., Bogduk, N., 2004). В медицинската общественост се застъпва становището, че хроничната болка е заболяване (Niv. D., Devor, M., 2004). По литературни данни 20 % от всички хора и 50 % от възрастното население страдат от хронични болки. Над 40 % от тях съобщават, че лечението им е било неадекватно (Breivik, H., 2005).

Съобразно патофизиологичните механизми болката се дефинира като ноцицептивна или невропатна. Ноцицептивната

болка възниква след активиране на ноцицепторите при интактни еферентни сензорни пътища. Като правило ноцицептивната болка се повлиява добре от неопиоидни и опиоидни аналгетици. Невропатната болка, възниква след активиране на ноцицепторите на фона на съществуващи структурни и функционални увреждания на нервната система и увеличена йонна проницаемост на мембраните. Невропатната болка се повлиява добре от антиконвулсантни и антидепресантни лекарства.

Съобразно локализацията болката може да бъде проприоцептивна (мускули, кости, стави), висцерална (дисменорея, калкулоза, миокарден инфаркт, язвена болест, колики), орофациална (зъбобол, невралгии), цефалгична (главоболие, мигрена, радикулит), които имат специфични особености и подходи за фармакологично третиране. Често в класификациите, особено с оглед спецификата на лечение, се говори за ракова болка, остеопоротична болка, артритна болка и други, които имат характерна патогенеза и специфична фармакотерапия.

Световната Здравна Организация (СЗО) предложи на Общото Събрание на ООН да включи като свой приоритет клаузата, че „Лечението на болката е универсално човешко право и морален и професионален дълг на лекаря” (Cousins, M. J., et al., 2004). Тази клауза е включена с консенсус и в Европейската Конституция. Понастоящем е общоприето, че неадекватното лечение на болката е индикация за отсъствие на етично отношение към индивида и показател за суб-стандартно равнище на здравеопазване и не-

ефективни социални системи.

В последните няколко години Европейската Агенция за Лекарствени Продукти (European Medicinal Agency) издава указания (guidelines) за лечение на болката, които се базират на механизъм-насочени терапевтични подходи и индивидуализирано лечение.

В нашата работа интересът бе съсредоточен върху два типа хормонално-обусловена болка:

- Тази при остеопороза - хормонално зависима, със смесен механизъм, соматична. Удължаването на живота поставя остро въпроса за отсрочване/забавяне на остеопорозата и намаляване на фрактурите или риска от тях. В същото време хормоно-заместителната и бифосфонатна терапия на остеопорозата показва сериозни рискове, което доведе до промени в КХП с цел да се намали риска от фрактури или злокачествени процеси при хормонозаместителната терапия
- При дисменорея болката също е хормонално-зависима, но висцерален тип, с ноцицептивен механизъм, което предопределя най-често употребата на НСПВС.

Проблемът за нежеланите реакции от прилагането на лекарствени продукти и особено аналгетици, е във фокуса на превантивните действия на Европейската и Национални Агенции за Лекарствени Продукти. Налице са засилени мерки за проследяване на нежеланите лекарствени реакции породени от продължително прилагане на аналгетични лекарства с различен

механизъм на действие. Ако при НСПВС (неопиоидни аналгетици) едни от водещите нежелани реакции са сърдечно-съдовите увреждания, улцерогенния ефект, нефро- и хепатотоксичността и това резултира в регулаторни промени на индикациите и дозировките, то при опиоидните аналгетици проблема с развитието на толерантност и зависимост придобива все по-голямо значение. Развитие на бърз толеранс при терапевтична употреба (напр. при лечение на миокарден инфаркт), потискането на имунния отговор, определянето на опиоидната зависимост като "хронична, рецидивираща мозъчна болест" са проблеми, които ангажират научната общност.

В настоящия дисертационен труд са представени нови подходи за лечение на два хормонално-зависими типа болка при дисменорея и остеопороза. Заедно с това е направен опит за облекчаване на имunosупресията и интегративните поведенчески промени при развитие на зависимост към морфин с блокиране NOS чрез прилагането на специфичен инхибитор.

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

**Цел** - Оптимизиране аналгетичния ефект на синтетични и растителни продукти и подходи за намаляване на нежеланите лекарствени реакции при лечение на болката.

За решаването на тази основна цел формулирахме две подцели:

1. Един от подходите за оптимизиране лечението на болката е механизъм-насоченото лечение. Създаване/разработване на два модела на хормонално-обусловена различен тип болка: соматична – остеопороза и висцерална – дисменорея. Върху тези модели са проследени ефектите на биологично-активни вещества от български лечебни растения, с което биха се избегнали/отсрочили НЛР на бифосфонати и хормоно-заместителна терапия, или класически НСПВС.

2. Чрез повлияване системата на Азотно-оксидната синтаза да се облекчат/модулират водещи НЛР към опиоиди – поведенчески прояви на зависимост/абстиненция, толерантност към кардиоваскуларните ефекти на морфин и имunosупресивния ефект на опиоидите.

За изпълнение на така формулираната цел и подцели си поставихме следните **задачи**:

1. Да се разработи модел на постменопаузална остеопороза и да се проследи отсрочването и забавянето на скоростта на развитие на остеопороза от стандартизиран екстракт от *Artem*, в сравнение с

фитоестрогена Генистеин.

1.1. Да се въведе метод DEXA за изследване на костна плътност и да се отчитат промените в телесна маса на малки животни за проследяване развитието на остеопороза и повлияването на процеса от лечебното третиране.

1.2. Да се извърши хистохимично охарактеризиране на костните промени при развитие на остеопороза и повлияването от третирането със стандартизиран екстракт на Аrium и фитоестрогена Генистеин.

1.3. Да се проследят нивата на RANKL и IL6, като маркери за остеолиза и възпаление – степен/тежест на развитие на остеопороза и се отчете ефекта на Аrium и фитоестрогена Генистеин.

1.4. Да се проучат промените в болковия праг при остеопороза и повлияването от Аrium и фитоестрогена Генистеин.

1.5. Да се проследи аналгетичния ефект на метамизол при остеопоротична болка.

2. Да се разработи *ex vivo/in vitro* експериментален модел на хормонално-обусловена „дисменорея” и се верифицира възможността за изследване „аналгетичен” ефект чрез прилагане на утвърдения метамизол

2.1. Предизвикване на резки изменения в нивата на естрогени и гестагени като хормонален еквивалент на симплифициран дисменорея - подобен функционален модел.

2.2. След хормоналното третиране изолиране на гладкомускулен препарати от маотчен рог за изследване ефекта на

метамизол върху амплитудата и честотата на миогенни и спонтанни контракции.

3. Да се изследва модулацията от системата на азотния оксид върху промените в поведенчески и вегетативни прояви при опиоидна толерантност/абстиненция

4. Да се верифицират промените в нивата на NOS в стволови ядра на главния мозък, с доказано участие в реализацията на толерантност и зависимост/абстиненция към морфин.

5. Да се проучи модулиращия ефект на NOS инхибиция върху развитието на ранен толеранс към някои сърдечно-съдови ефекти на морфин. Опиоидите са средство на избор за купиране остра висцерална болка при миокарден инфаркт.

6. Да се проучи модулацията на имunosупресивния ефект на опиоидите от системата L-Arg-NO.

### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 1. Експериментални животни

Женски и мъжки бели плъхове (Wistar), получени от вивариума на Медицински Университет София, съпоставени в контролирана лабораторна обстановка с естествен ден / нощ циркадиален ритъм, 22° С , при свободен достъп до вода и гранулирана храна.

Използваните субстанции са от Sigma-Aldrich и са прилагани в обем 1 ml/kg, разтворени във физиологичен разтвор или растително масло (Genistein). Всички *in vivo* експерименти и манипулации са били одобрени от Комитет за етика на научните изследвания на МУ София.

#### 2. *In vivo* методи:

##### 2.1. Модел на постменопаузална остеопороза

Опитите бяха извършени на женски плъхове (180 - 185 g.), отглеждани без ограничаване на двигателната активност. При част от тях (n=36), избрани *at randome*, под обща анестезия бе извършена билатерална овариектомия. Три месеца след оперативната интервенция животните са разпределени в групи (А) по 12 в група и третирани както следва: (А1) неовариектомирани-нетретирани, (А2) овариектомирани - нетретирани, (А3) овариектомирани - третирани с Genistein (10 mg/ml, в стерилно растително масло), (А4) овариектомирани - третирани с екстракт от *Apium* (10 mg/ml, във физиологичен разтвор). Genistein или екстракт от *Apium* са прилагани ежедневно в продължение на 3

месеца в доза 2.5 mg/kg, s.c. или 2.4 mg/kg quercetin-еквивалент p.o.

- Фитохимични методи за изолиране, пречистване и верификация на екстракт от *Arium* са проведени в ИОХЦФ – БАН. Стандартизацията на екстракта от *Arium* е извършена чрез квантифициране на тоталното съдържание на феноли и флавоноиди в сухия остатък.

- DEXA при малки животни - приложен е метод на dual energy X-ray absorbtometry. Изследванията са извършени с дензитометър (DEXA hologic discovery A, v. 13. 2. 3), снабден със софтуер за изследване на малки животни (Small animal, WB rat). (Методите са приложени в изследвания, проведени в МБАЛ „Александровска“).

- Методи за изследване на ноцицепция (*Plantar heat test, Hind paw pressure test, Carrageenan-индуциран оток*).

## 2.2. Модел на опиоидна толерантност и зависимост

Опиоидната толерантност и зависимост бе индуцирана чрез морфин инжектиран ежедневно, двукратно продължение на 11 дни в повишаваща се, обща, дневна доза (5 mg/kg, s.c. - 30 mg/kg, s.c.). L-NAME бе инжектиран ежедневно в продължение на 11 дни в дневна доза 5 mg/kg, i. p..

- Ноцицептивните прагове са определяни с radiant heat tail-flick test.

- Налоксон-преципитирана (5 mg/kg, i.p. еднократно)

## абстиненция на 11 ден

За квантифициране на симптомите на толерантност, зависимост и абстиненция е разработена и приложена оригинална новосъздадена кумулативна дигитална скала.

СИМПТОМ	ТОЧКИ / 10 мин	МАКСИМУМ
1) Дефекация (твърди изпражнения)	1 за всеки 4	2
2) Саливация, лакримация	1 за всяка реакция	2
3) Пилоерекция на гърба, птоза	1 за всеки епизод от мин. 60 s	5
4) Душене, чесане, гризане	1 за всеки епизод от мин. 60 s	5
5) Тракане на зъби, дъвчене	1 за всеки епизод от мин. 60 s	5
6) Близане на гениталиите	1 за всеки мин. 30 s нон-стоп	5
7) Вокализация при допир през 2 мин	1 за всеки епизод	5
8) Агресия при допир през 2 мин	1 за всеки епизод	5
9) Загуба на телесно тегло	1 за всеки 2.5% загуба след 1 ден	8
10) Избягване на неприятно дразнене	1 за всеки 2 опита	8
11) Изтръскване „мокро куче“	1 за всеки мин. 60 s нон-стоп	8
12) Хиперактивност, търсене, изправяне	1 за всеки мин. 60 s нон-стоп	8
13) Гърчене, свиване, извиване	1 за всеки епизод	8
14) Диария (течни изпражнения)	1 за всеки епизод	8
15) Поза „восьчна фигура“	1 за всеки мин. 60 s нон-стоп	10
16) Прострация	1 за всеки мин. 30 s нон-стоп	10

- „Кардиоваскуларен“ модел на експериментална опиоидна толерантност/ зависимост ни даде възможност да отчетем промени в артериалното налягане и сърдечна честота.

- Животните бяха катетеризирани (десните феморални съдове за *on line*-мониторирание на артериалното кръвно налягане (BP) и пулсова честота (HR), респ. за инжектиране на изследваните субстанции) и третирани както следва: (D1) Морфин, инжектиран на 24 ч и 72 ч в доза 0.5 mg/ kg, (D2) L-NAME, инжектиран в доза 6.0 mg / kg, 15 мин преди морфин инжектиран както в D1, (D3) L-

Arginine, инжектиран в доза 300 mg / kg, 15 мин преди морфин инжектиран както в D1, (D4) L-Arginine, инжектиран както в D3, 20 мин преди L-NAME и морфин инжектирани както в D2.

- Действието на изследваните субстанции е проследявано на обездвижени животни (Ballman type KN 326 restrainer, Natsume) в продължение на 120 мин.

- Резултатите са представени като % изменения (+/-) на систолно (SBP), диастолно (DBP), средно (MBP) артериално кръвно налягане и пулсова честота.

### 2.3. *In vitro/ ex vivo* модел на "дисменорея"

Извършвана бе трансабдоминална билатерална овариектомия. След двуседмичен възстановителен период животните в 5 последователни дни се третират с estradiol (30 µg, s.c.), при което се симулира овариална фоликулна фаза. На следващия ден (при краткотрайна обща анестезия, ketamine 50 mg/ kg, i. p.) подкожно интерскапулно се имплантират matrix driven delivery system с постоянно освобождаване на levonorgestrel (5 µg/час), с което се симулира овариална лутеална фаза (16 животни) или плацебо (0.9 % NaCl), с което се симулира ановулаторна фаза.

Предизвиканите резки изменения в нивата на естрогени и гестагени са хормонален еквивалент на симплифициран дисменорея-подобен функционален модел.

- *Ex vivo* изолиране на маточен рог

### 3. *In vitro* методи:

3.1 Електрическа и с PGE2 стимулация на изолиран маточен рог - Контрактилната активност на миометриума се активира чрез суперфузия на хранителен разтвор, съдържащ PGF2 $\alpha$  или миотропна електрическа стимулация с правоъгълни импулси (50V, 10Hz, 6ms, 5s) през 120 сек интервали. В продължение на 120-150 мин се регистрират спонтанни и евокирани контракции. Анализират се средните амплитуди (mN) и честоти (контракции/10 мин) в 10 мин епизоди преди и по време на PGF2 $\alpha$  суперфузия.

3.2 Дензитометрия само на фибула и тибия. Хистоморфологично и хистометрично изследване на костните промени. Морфометричните измервания включват обем на костната част (% от обема на трабекуларната тъкан), дебелина на трабекулите (дебелина на костните трабекули, организирани като ламели), брой трабекули/mm, интертрабекуларна дистанция, кортикална дебелина (Parfitt et al., 1987). (Методите приложени за изследвания са изпълнени в Катедрата по Анатомия, хистология и ембриология на МУ София).

3.3 Нива на RANKL и IL-6, като маркери за остеопороза и възпаление (ELISA методи за определяне на IL-6 и RANKL (NF- $\kappa$ B) в серум). Използвани са комерсиални кит ELISA (Abcam) за определяне на IL-6 и NF- $\kappa$ B в серум.

3.4 Concanavalin A - индуцирана лимфоцитна пролиферация при експериментална опиоидна толерантност / зависимост – Клетъчните суспензии, получени от слезка на животни, третирани с морфин, L-NAME, морфин и L-NAME или PS се обработват по

протокол, стимулират с Concanavalin A и маркират с <sup>3</sup>H-Thymidine. <sup>3</sup>H-радиоактивността в пробите е определена (като разпади / мин (DPM), а индекс на пролиферация (PI) е изчислен като отношение DPM тест / DPM контрол.

3.5 NO-синтазна активност в определени мозъчни ядра (Експресия на невронална NADPH diaphorase (NO-синтаза) при експериментална опиоидна толерантност/зависимост) - Направено е хистохимичното определяне на NADPH diaphorase с модифицирана процедура на Scherer-Singler (Scherer-Singler et al., 1983) върху свободно плуващи тъкълни срези (30 µm) от periaqueductal gray matter (PAG), dorsal raphe nucleus (DRN), pedunculopontine tegmental nucleus (PPN), laterodorsal tegmental nucleus (LTD). Интензитетът на оцветяване е оценяван с computer-assisted image analysis като optical density arbitrary units (OD) в граници от 0 (абсолютна прозрачност) до 254 (абсолютна плътност) OD. Диафораза-позитивни клетки не са открити в срези, които са инкубирани в медиум без NADPH.

3.6 Апоптоза на тимоцити и ДНК фрагментация (Апоптоза / ДНК TUNEL и indirect immunoperoxidase оцветяване са прилагани (Marinova, Ts., 2005). - Double staining of IHC and 'terminal transferase dUTP end-labeling'(TUNEL) reveals the nature of apoptotic cells (Vander Loos 1999). Agarose gel електрофореза на фрагментирана DNA , оцветена с ethidium bromide, е визуализирана в ултравиолетова светлина, със светлинен микроскоп, по метод описан от Marinova et al., 2000.

#### **4. Методи за статистически анализ.**

Данните са представени като средна  $\pm$  SEM. Разликите между групите са оценявани по Student's t-test при минимално ниво на достоверност  $P \leq 0.05$ .

## IV. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РЕЗУЛТАТИ

### 1. Ефекти на екстракт от *Apium* и *Genistein* върху динамиката на някои структурни и функционални изменения съпътстващи развитието на експериментална остеопороза

#### 1. 1. Динамични промени на телесната маса

Измерването на телесната маса на животните в отделните групи преди оперативните интервенции показва, че при всички групи животни не съществуват статистически достоверни разлики между средните стойности на телесната маса. Измерването на телесната маса 6 месеца след оперативните интервенции показва, че нарастването на телесната маса е най-изразено при овариектомираните животни. Данните за телесната маса са представени на Табл. 1. 1.

Таблица 1. 1. Средна телесна маса (g)

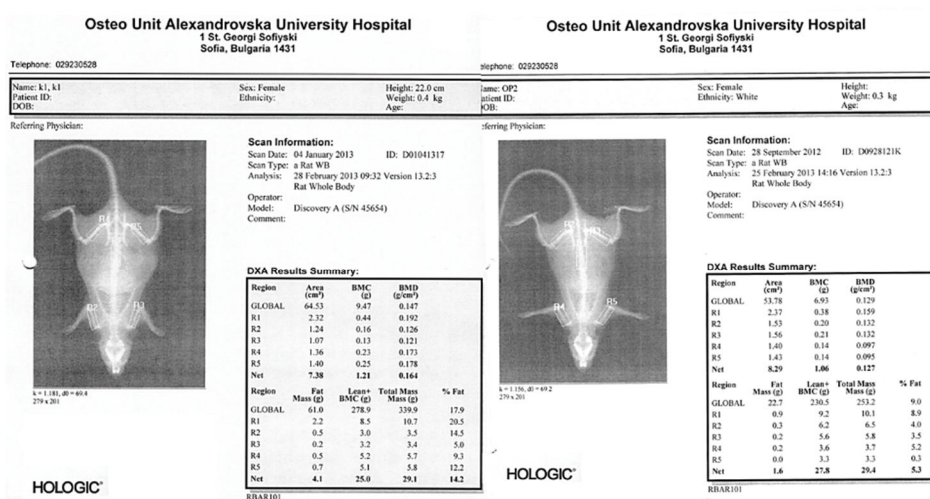
Група, интервенция	Телесна маса <i>ante-operationem</i>	Телесна маса <i>post-operationem</i>
Контроли (шам-оперирани)	231.7 ± 4.1	276.4 ± 12.6**
Овариектомирани	239.2 ± 16.5	317.1 ± 10.8**

\*\*P ≤ 0.01 vs тегло *ante-operationem*, Контрол шам-оперирани

Телесната маса е измерена отново в края на втория месец от третирането с *Genistein* или екстракт на *Apium*. Данните показват, че разликите между средните стойности на телесната маса на изследваните 4 групи животни (овариектомирани, шам-

оперирани, третириани с Genistein и третириани с екстракт на *Apium*) са статистически недостоверни.

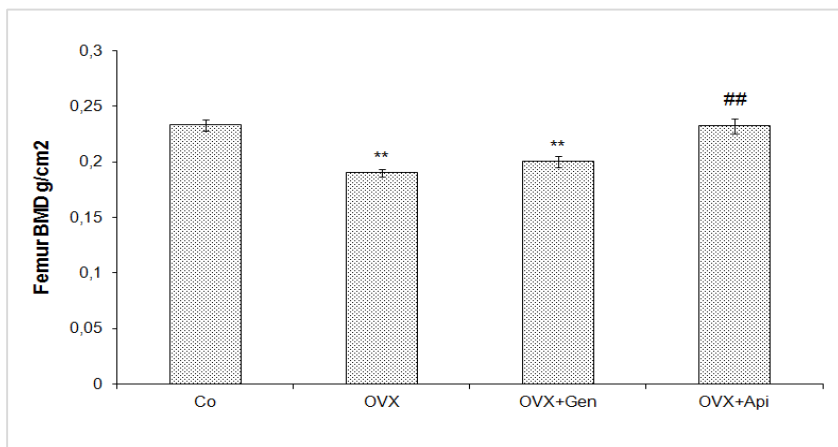
**1.2 Динамични промени на костната минерална плътност (BMD) -** Дензитометрично изследване бе проведено, както на контролни, така и на овариектомизирани плъхове (остеопороза) и третириани с *Apium* 8 месеца след овариектомията. Данните са илюстрирани на фиг. 1. 2.



**Фигура 1. 2. Дензитометрично изследване на контролни и овариектомизирани плъхове**

Повторното измерване на BMD е направено 8 месеца след хирургичните интервенции. Данните показват, че костната минерална плътност на фемуралната кост на всички овариектомизирани плъхове (група контрол OVX ) е спаднала със средно  $18.4 \pm 2.9 \%$  ( $P \leq 0.01$  vs Co).

При продължително третиране с Genistein (2.5 mg.kg<sup>-1</sup>) се наблюдава тенденция за увеличаване (статистически недостоверно нарастване) на BMD (група Genistein / OVX). За разлика от това продължителното прилагане на екстракт на *Apium* има изразен благоприятен ефект срещу намаляването на BMD настъпила от експериментално предизвиканата остеопороза. Данните показват, че костната минерална плътност на група *Apium* / OVX е  $0.233 \pm 0.007 \text{ g.cm}^{-3}$ , докато BMD на група контрол OVX е  $0.19 \pm 0.003 \text{ g.cm}^{-3}$  ( $P \leq 0.01$ ). Данните от изследванията на BMD на изследваните групи животни са представени на Фиг. 1.2.1



Co - контрол шам оперирани, OVX - контрол овариектомирани, OVX Gen - овариектомирани третирани с Genistein, OVX Api - овариектомирани третирани с екстракт на *Apium*

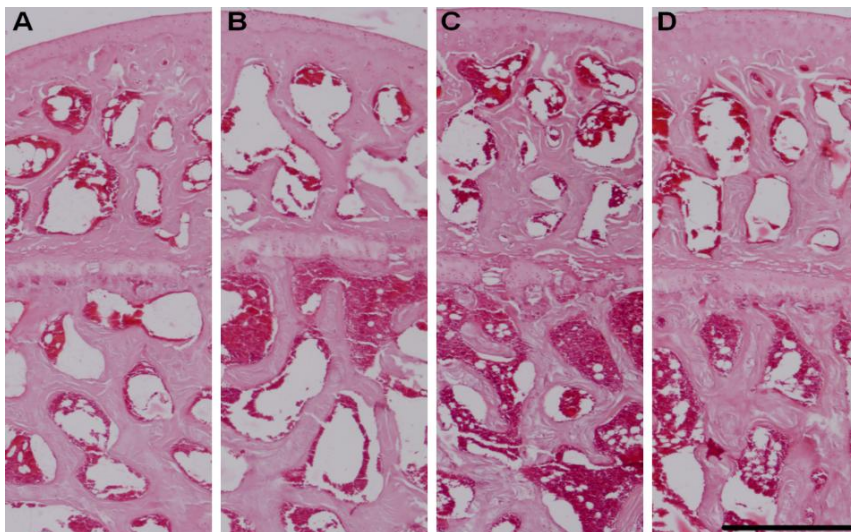
\*\*  $P \leq 0.01$  vs Co, ##  $P \leq 0.01$  vs OVX

**Фигура 1.2.1 Костна минерална плътност (BMD) на фемурална кост**

### **1. 3. Динамични промени на костната микроархитектура**

Хистологичната структура на проксималната част на фемуралната кост са представени на Фиг. 1. 3. 1.. Костите на животните от група

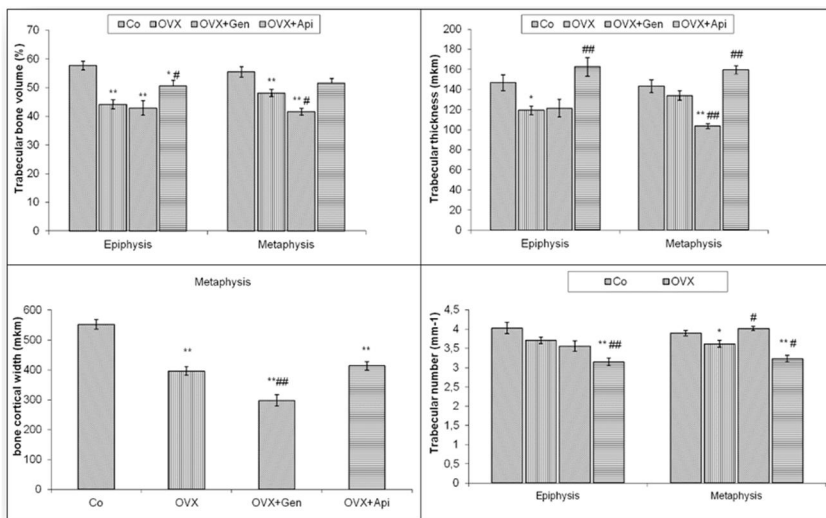
контрол показват нормална, непроменена структура. Трабекулите формират сложна мрежа и само малък брой трабекули остават свободни в краищата. Костномозъчните пространства между трабекулите са сравнително малки. Значителни промени настъпват в костната трабекулна структура на овариектомирани плъхове. В епифизната ламина има значително по-висока пролиферативна активност. Паралелно с това настъпва изтъняване на трабекулите и увеличаване на свободните им краища, което предизвиква разширяване на интертрабекулните пространства (Фиг.1.3.1B). Фемуралната кост на третираните с Genistein плъхове имат значително по-добра костна архитектура на (Фиг.1.3.1C). Още по-силен благоприятен ефект върху костната структура има третирането на животните с екстракт на *Arium* (Фиг.1.3.1D), от което нормалната костна структура е възстановена почти напълно.



A - контрол шам оперирани, B - контрол овариектомирани, C - третирани с Genistein, D - третирани с екстракт на *Apium*. Скала на маркировката 500  $\mu$ m  
Светлинна микроскопия, Оцветяване с хематоксилин – еозин

**Фигура 1. 3.1. Представителни микрофотографии на фронтални лонгитудинални срези от проксимална част на фемурална кост**

Детайлните данни за ефекта на екстракт на *Apium* и Genistein върху трабекулната микроархитектура на фемуралната и тибиялна кост (обем и брой на трабекулите, и дебелина на костния кортикален слой) са представени на Фиг. 1.3.2. Данните показват, че 9 месеца след овариектомията обема на костните трабекули в проксимална епифиза е намален съществено.



Co - контрол шам оперирани, OVX - контрол овариектомирани, OVX Gen -овариектомирани третирани с Genistein, OVX Api - овариектомирани третирани с екстракт на Apium

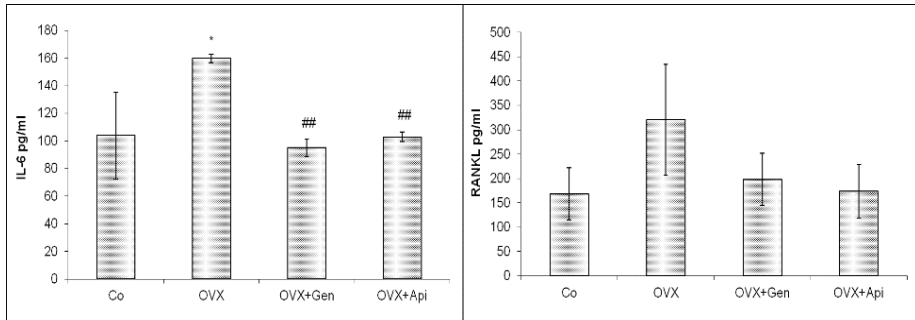
\*  $P \leq 0.05$  vs Co, \*\*  $P \leq 0.01$  vs Co, #  $P \leq 0.05$  vs OVX, ##  $P \leq 0.01$  vs OVX, мкм мм

**Фигура 1.3.2. Ефект на Genistein и екстракт на Apium върху хистоморфологичните параметри обем на трабекулната кост (%), дебелина на трабекулната кост (µм), широчина на кортикалната кост (µм), брой трабекулни ламели и трабекулна микроархитектура в епифиза и метафиза на фемурална кост**

#### **1.4. Динамични промени на серумните нива на Рецептор активиран NF κB лиганд (RANKL) и Интерлевкин 6 (IL-6)**

Края на експериментите *in vivo* съвпада с проследяване на динамичните промени на серумните нива на IL-6 и RANKL. Резултатите от изследванията са представени на Фиг. 1. 4. Данните показват, че има статистически достоверно увеличение на нивото на IL-6 в серума на овариектомираните животни. Наблюдава се тенденция за нарастване на нивото на RANKL в серума, която обаче е статистически недостоверна. Прилагането на екстракт на

*Apium* или Genistein превантира настъпващото след овариектомия нарастване на IL-6 и RANKL в серума.



Co - контрол шам оперирани, OVX - контрол овариектомирани, OVX Gen - овариектомирани третирани с Genistein, OVX Api - овариектомирани третирани с екстракт на *Apium*

\*  $P \leq 0.05$  vs Co, ##  $P \leq 0.01$  vs OVX

**Фигура 1. 4. Ефект на Genistein и екстракт на *Apium* върху серумите нива на (А) Интерлевкин 6 (IL-6), (В) Рецептор активиран NFκB лиганд (RANKL)**

### **1.5. Динамични промени на ноцицептивните прагове при механична болка и периартикуларен едем при Carrageenan-индуцирана инфламаторна реакция**

Данните показват, че овариектомията предизвиква значително понижаване на ноцицептивния праг при усещане на механична болка. Обратно на това се наблюдава при плъхове, третирани с екстракт на *Apium* или Genistein. Данните показват, че при продължителна субституция с тези продукти ноцицептивните прагове при предизвикване на механична болка не се променят в сравнение с ноцицептивните прагове на шам-оперирани контролни животни. Инфламаторна реакция със значителен едем

на задната лапа, проявена хиперемия и силна хипералгезия се проявяват 2 часа след инжектирането на *Carrageenan*. Данните от тези изследвания са представени на Табл. 1. 5.1.

Данните показват, че инфламаторният едем е най-силен (60% увеличение) при овариектомираните плъхове. Значително по-слаб инфламаторен едем се развива в плъховете третирани с екстракт на *Apium* (22.2% увеличение) или *Genistein* (18.6% увеличение).

**Таблица 1. 5.1. Периартикуларен едем при *Carrageenan*-индуцирана инфламаторна реакция (Обема на отока е измерен плетизмометрично)**

Група, третирани	Периартикуларен едем (ml)
Контрола	1.94 ± 0.05
OVX	3.11 ± 0.3*
OVX, <i>Genistein</i>	2.53 ± 0.14 <sup>#</sup>
OVX, <i>Apium</i>	2.42 ± 0.11

\*P ≤ 0.05 vs Контрол, <sup>#</sup>P ≤ 0.05 vs OVX, Контрола шам-оперирани, OVX овариектомирани

### **1.6. Ефект на аналгин (*metamizol*) върху инфламаторната болка при фармакотерапия на експериментална остеопороза с екстракт на *Apium* или *Genistein***

Данните показват, че аналгин има добре проявен антиноцицептивен ефект при всички животни от контролната група. Ноцицептивният праг се понижава много силно, т. е. болковата чувствителност е силно увеличена при развитието на

остеопороза след овариектомия. При тези условия антиноцицептивното действие на аналгин е отново много силно проявено. Хроничното третиране с екстракт на *Apium* или Genistein намалява достоверно засилената от остеопорозата болкова чувствителност. На този фон силата на аналгин-индуцирания антиноцицептивен ефект не се различава от силата на антиноцицептивното действие на аналгин при животните от контролната група. Резултатите от тези изследванията са представени на Таблица 1.6.

**Таблица 1. 6. Ефект на аналгин (*metamizol*) върху Carrageenan-индуцирана хипералгезия (Ноцицентивните прагове са определени с Plantar heat тест и Hind paw pressure тест)**

Група, третиране	Plantar heat тест (s)	Hind paw pressure тест (g.cm <sup>-2</sup> )
Контрол	9.7 ± 0.5	6.25 ± 0.9
Контрол, аналгин	14.2 ± 1.9	12.1 ± 1.2
OVX	6.8 ± 0.4	3.94 ± 0.1
OVX, аналгин	12.1 ± 0.25	9.21 ± 2.1
OVX, Genistein	10.5 ± 1.2 <sup>##</sup>	7.21 ± 0.9 <sup>##</sup>
OVX, Genistein, аналгин	15.77 ± 0.9 <sup>**</sup>	14.2 ± 1.2 <sup>**</sup>
OVX, Apium	9.38 ± 0.9 <sup>####</sup>	8.2 ± 0.1 <sup>####</sup>
OVX, Apium, аналгин	14.5 ± 1.5 <sup>*</sup>	13.5 ± 2.1 <sup>*</sup>

\*P ≤ 0.05 vs OVX, аналгин, \*\*P ≤ 0.01 vs OVX, аналгин, ##P ≤ 0.01 vs OVX, #### P ≤ 0.001 vs OVX Контрол шам-оперирани, OVX овариектомирани

## **2. „In vitro еквивалент“ на спастична висцерална болка при симплифициран хормонално симулиран дисменорея-подобен функционален модел: Ефект на PG F2α и аналгин (*metamizol*)**

Резултатите показват, че PG F2 $\alpha$  потенцира евокираните миогенни контракции на препаратите изолирани от група плацебо (контрол) приблизително 6 пъти и тези на препаратите изолирани от група „дисменорея“ приблизително 4.5 пъти. Не е установена статистически значима разлика между двете групи (Табл. 2. 1).

**Таблица 2.1. Ефект на аналгин върху амплитудата и честотата на миогенни и спонтанни контракции (отношение post- / pre - PG F2 $\alpha$ ) при хормонално симулиран дисменорея - подобен функционален модел *in vivo***

Активност/ Третиране	Миогенна	Спонтанна	Брой контракции за 10 мин
Плацебо	5.979 $\pm$ 1.172 (n 16)	4.050 $\pm$ 0.864 (n 8)	1.848 $\pm$ 0.127 (n 16)
„Дисменорея“	4.443 $\pm$ 0.917 (n 16)	131.856 $\pm$ 109.25 (n 10)	2.233 $\pm$ 0.855 (n 16)
Аналгин	2.496 $\pm$ 0.277 <sup>a,c</sup> (n 16)	3.310 $\pm$ 0.984 <sup>a</sup> (n 5)	1.675 $\pm$ 0.075 <sup>b,d</sup> (n 16)

(a) P  $\leq$  0.001 и (b) P  $\leq$  0.05 vs „дисменорея“, (c) P  $\leq$  0.001 и (d) P  $\leq$  0.05 vs плацебо, (n) брой изследвани препарати от съответната група

По аналогичен начин ефектът на аналгин върху евокираните миогенни контракции е проследен в 10 мин епизоди от суперфузията на препаратите от група „дисменорея“ за 30 мин с хранителен разтвор съдържащ на 500  $\mu$ M аналгин. Данните показват, че при тази схема на фармакологично третиране PG F2 $\alpha$  увеличава амплитудата на евокираните контракции над 2.5 пъти (Табл. 2. 1.).

Спонтанна съкратителна активност с амплитуда на съкращенията варираща от 0.25 до 0.50 от амплитуда на евокираните контракции е регистрирана в 50 % от препаратите изолирани от група плацебо и 63 % от препаратите изолирани от

група „дисменорея“. Данните показват, че честотата на спонтанните контракции (съкращения / 10 мин) на препаратите изолирани от група плацебо е  $4.50 \pm 0.87$  и на препаратите изолирани от група „дисменорея“ е  $5.75 \pm 0.85$ . Резултатите показват, че PG F<sub>2</sub> $\alpha$  засилва умерено спонтанната съкратителна активност и слабо тонуса на препаратите изолирани от група плацебо. PG F<sub>2</sub> $\alpha$  потенцира много силно спонтанните контракции и умерено повишава тонуса на препаратите изолирани от група „дисменорея“ (Табл. 2. 1.).

### **3. Нитроксидергична модулация на опиоидната толерантност / зависимост**

#### **3.1. Модулация на поведенческите реакции**

##### ***3.1.1. Ефект на L-NAME върху Морфин-индуцираните поведенски реакции***

Поведенските реакции се измерват с новосъздадена кумулативна количествена оценка (точки), която дава възможност за квантифициране на симптомите на толерантност, зависимост и абстиненция.

Данните показват, че няма статистически достоверни разлики в поведението на наивните плъхове (група G4) и плъховете подложени на продължително третиране с L-NAME (група G2) или на остро третиране с naloxone (група G8) (Табл.3.1.1.).

**Таблица 3. 1. 1. Ефект на L-NAME върху морфин-индуцираните поведенски реакции (Поведенските реакции се измерват с кумулативна количествена оценка, точки).**

Група, третиране	Точки /10 min	Точки/ 30 min
Морфин хронично третиране (G1)	17.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	42.5 ± 6.8 <sup>a</sup>
L-NAME хронично третиране (G2)	6.0 ± 0.9	17.0 ± 3.7
L-NAME, морфин хронично третиране (G3)	6.0 ± 0.9	17.0 ± 4.2
Контрол, наивни, (G4)	4.0 ± 0.7	12.0 ± 2.6
Абстиненция (G5)	47.0 ± 4.3 <sup>b</sup>	126.0 ± 19.3 <sup>b</sup>
L-NAME хронично третиране, абстиненция (G6)	14.5 ± 2.4 <sup>c, d</sup>	39.5 ± 7.4 <sup>c, d</sup>
Морфин остро третиране (G7)	7.2 ± 1.2	19.0 ± 6.1
Naloxone остро третиране (G8)	4.5 ± 0.4	13.5 ± 1.9

<sup>a</sup> P ≤ 0.01 vs G4, <sup>b</sup> P ≤ 0.001 vs G1, <sup>c</sup> P ≤ 0.05 vs G4, <sup>d</sup> P ≤ 0.001 vs G5

Остро третиране с морфин (група G1, ден 1) предизвиква типични поведенски реакции: стереотипична моторна активност и опашен рефлекс тип Straub, които се редуват с епизоди на каталепсия. Острото третиране с L-NAME (група G3, ден 1) не променя както поведенските реакции, така и аналгетичния ефект, предизвикани от остро третиране с морфин. Резултатите от изследването на ноцицептивните прагове са представени на Табл.3.1.2. И демонстрират, че при комбинираното хронично третиране с L-NAME и морфин (G3) не настъпва развиване на толерантност към аналгетичното действие на морфин, което се манифестира с увеличаване на латентното време на  $13.84 \pm 1.24$  s.

**Таблица 3. 1. 2. Ефект на L-NAME върху аналгетичното действие на морфин (Ноцицептивните прагове се определят с тест Tail-flick)**

Група, третиране	Латентно време (s)
Контрол, наивни, (G4)	5.62 ± 0.62
Морфин остро третиране (G1, ден 1)	14.81 ± 1.34 <sup>a</sup>
L-NAME, морфин остро третиране (G3, ден 1)	15.33 ± 1.01 <sup>a</sup>
Морфин хронично третиране (G1)	7.45 ± 1.02
L-NAME, морфин хронично третиране (G3)	13.84 ± 1.24 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> P ≤ 0.001 vs G4

Продължаващото третиране с морфин през следващите 5 дни не променя съществено латентното време, но се съпровожда с изостряне на симптомите на опиоидна зависимост, наблюдавани преди да бъде инжектирана поредната доза морфин. Различията между поведението на животните от група G1 и група G3 са най-демонстративни по отношение на naloxone-преципитирата абстиненция. Абстинентния синдром при група G5 е доминиран от гърчене, свиване, извиване, тракане на зъби, пилоерекция на гърба, птоза, вокализация при допир, поза „восъчна фигура“, избягване на неприятно дразнене, диария и тежка прострация. В контраст на тези картина симптомите на прострация, диария, поза „восъчна фигура“ и вокализация при допир са много по-облекчени при абстинентния синдром на плъхове третиращи хронично с L-NAME (G6). При тези животни абстинентния синдром е доминиран от душеене, чесане, хиперактивност, търсене, изправяне. След 7 дни хронично третиране с морфин загубата на телесно тегло на

животните с абстиненция (G5) е  $10.1 \pm 1.1$  g, която намалява достоверно на  $7.4 \pm 0.9$  g ( $P \leq 0.05$ ) при животните с абстиненция, които са били третирани хронично с L-NAME (G6). Анализът показва, че кумулативната стойност (точки / 30 min) квантифицираща поведението при наивните плъхове (G4) е  $12.0 \pm 2.6$ , докато на плъховете хронично третирани с морфин е  $42.5 \pm 6.8$  (G1). Кумулативната стойност, квантифицираща поведението при животните с naloxone-преципитирана абстиненция (G5) е  $126.0 \pm 19.3$ . В контраст на това кумулативната стойност, квантифицираща поведението при животните с абстиненция, които са били третирани хронично с L-NAME (G6) е  $39.5 \pm 7.4$ , която е над 3 пъти по-малка от тази при животните от група G5 (Табл. 3. 1. 2.).

### **3. 2. NADPH diaphorase активност в стволите ядра на главния мозък**

С оглед търсенето на корелация/верификация на ин vivo нитроксидергичната модулация на опиоидната толерантност / зависимост бе изследвана експресията на NADPH дифоразната активност в следните четири ядра на мозъчния ствол: Periaqueductal gray matter (PAG), Dorsal raphe nucleus (DRN), Pedunculopontine tegmental nucleus (PPN), Laterodorsal tegmental nucleus (LTN). Хистохимичните данни показват, че всички изследвани мозъчни ядра съдържат NADPH diaphorase позитивни неврони, като най-много такива неврони са намерени в PAG. Топографското разпределение и морфологичните особености на

тези неврони са характерни и за другите изследвани стволони ядра, но изследваните са въввлечени в болковата перцепция.

Дензитометричните изследвания доказват наличие на добре проявена NADPH diaphorase активност във всички изследвани ядра. Детайлизирани резултатите от тези изследвания са представени в Табл. 3. 2.

**Таблица 3. 2. Дензитометрична характеристика на NADPH diaphorase активност в стволоните ядра на главния мозък**

Група	Periaqueductal gray matter (PAG)	Dorsal raphe nucleus (DRN)	Pedunculopontine tegmental nucleus (PPN)	Laterodorsal tegmental nucleus (LTN)
G1	165.6 ± 6.1 <sup>a</sup>	175.4 ± 3.4 <sup>a</sup>	138.4 ± 3.2 <sup>a</sup>	142.7 ± 4.1 <sup>a</sup>
	(N 797)	(N 1694)	(N 1019)	(N 2192)
G2	120.0 ± 4.7 <sup>a</sup>	143.5 ± 7.3 <sup>a</sup>	117.6 ± 4.1 <sup>a</sup>	121.4 ± 3.9 <sup>a</sup>
	(N 1894)	(N 907)	(N 1290)	(N 598)
G3	147.2 ± 4.6 <sup>a</sup>	153.6 ± 7.7 <sup>a</sup>	128.1 ± 4.6 <sup>a</sup>	127.3 ± 5.1 <sup>a</sup>
	(N 2321)	(N 692)	(N 1534)	(N 656)
G4	214.7 ± 5.5	226.9 ± 5.5	208.3 ± 5.7	213.7 ± 6.2
	(N 1708)	(N 859)	(N 1376)	(N 812)
G5	241.1 ± 5.8 <sup>a</sup>	241.6 ± 7.2 <sup>a</sup>	239.5 ± 6.7 <sup>a</sup>	253.3 ± 1.1 <sup>a</sup>
	(N 2259)	(N 807)	(N 1902)	(N 207)
G6	238.4 ± 5.6 <sup>ab</sup>	237.6 ± 5.9 <sup>ab</sup>	237.9 ± 5.1 <sup>ab</sup>	242.5 ± 8.4 <sup>ab</sup>
	(N 2458)	(N 758)	(N 1718)	(N 900)
G7	189.5 ± 12.8	193.3 ± 13.4	189.4 ± 16.7	201.1 ± 17.9
	(N 2043)	(N 930)	(N 1490)	(N 991)
G8	215.8 ± 6.9	217.2 ± 5.4	219.7 ± 9.3	210.4 ± 15.7
	(N 2025)	(N 240)	(N 1652)	(N 1186)

<sup>a</sup> P ≤ 0.001 vs G4, <sup>b</sup> P ≤ 0.001 vs G2, (N) брой NADPH diaphorase позитивни неврони

Данните показват, че хроничното третиране с морфин понижава съществено (над 25 %) NADPH diaphorase активност във всички изследвани ядра на мозъчния ствол (G1 vs G4).

Аналогично, дори по-силно, е потискането на NADPH diaphorase активност предизвикано от хронично третиране с морфин и L-NAME (G3 vs G4). Най-силно е потискането на NADPH diaphorase активност след хронични третиране с L-NAME (G2 vs G4). За разлика от този ефект еднократното инжектиране на Na не предизвиква достоверни промени в NADPH diaphorase активност. Би могло да се спекулира, че данните от тази серия експерименти набелязват дори тенденция за увеличаване на броя на NADPH diaphorase позитивните неврони в изследваните стволони структури (G7 vs G4). При naloxone-предизвикан абстинентен синдром настъпва умерено покачване на NADPH diaphorase активност (G5 vs G4). Аналогични промени на NADPH diaphorase активност настъпват и при naloxone-предизвикан абстинентен синдром след хронично третиране с L-NAME (G6 vs G4). Данните показват, че naloxone *per se* не променя както NADPH diaphorase активност, така и броя на NADPH diaphorase позитивните неврони в изследваните ядра на мозъчния ствол на наивни животни (G8 vs G4).

### **3. 3. Ефект на NOS инхибиция върху развитието на ранен толеранс към някои сърдечно-съдови ефекти на морфин.**

Резултатите показват, че след първата инжекция на морфин настъпва транзиторна хипотония и брадикардия (група D1). Анализът на данните показва, че първото инжектиране на морфин понижава систолното артериално кръвно налягане (САН) с  $39 \pm 9\%$ , диастолното артериално кръвно налягане (ДАН) с  $59 \pm 10\%$  и

средното артериално кръвно налягане (ДАН) с  $52 \pm 10$  %. Едновременно с транзиторната хипотония настъпва и значителна брадикардия. Данните показват, че след първата инжекция на морфин понижението на пулсовата честота (ПЧ) е  $78 \pm 8$  %. Резултатите от проведените изследвания са представени на Табл. Повторно инжектиране на морфин, направено 48 часа след първата инжекция (II D1), предизвиква поява на толерантност към действието на морфин върху сърдечно-съдовата система. Този ефект е манифестиран с практически пълната липса на морфин-индуцирани промени на хемодинамиката (Табл. 3. 3.).

**Таблица 3. 3. Промени (%) на систолното артериално кръвно налягане, диастолното артериално кръвно налягане, средното артериално кръвно налягане и пулсовата честота след първото (I) и второто (II) инжектиране на морфин без (D1) и със (D2) предварително третиране с L-NAME**

Артериално налягане	I и II инжектиране на морфин (група животни)			
	I (D1)	II (D1)	I (D2)	II (D2)
<b>САН</b>	- $39 \pm 9$	$2 \pm 1^a$	- $46 \pm 7$	- $39 \pm 10$
<b>ДАН</b>	- $59 \pm 10$	$1 \pm 2^a$	- $58 \pm 10$	- $52 \pm 12$
<b>МАН</b>	- $52 \pm 10$	$1 \pm 2^a$	- $52 \pm 6$	- $46 \pm 12$
<b>ПЧ</b>	- $78 \pm 8$	- $13 \pm 6^a$	- $89 \pm 1$	- $73 \pm 8$

САН систолно артериално кръвно налягане, ДАН диастолно артериално кръвно налягане, МАН средно артериално кръвно налягане, ПЧ пулсова честота

<sup>a</sup>  $P \leq 0.001$  vs I (D1)

#### **4. Concanavalin A-индуцирана лимфоцитна пролиферация**

Резултатите от тази серия експерименти показват, че хроничното прилагане на морфин потиска силно лимфоцитната

пролиферация (G1 vs G4). Противоположен ефект върху лимфоцитната пролиферация се наблюдава при хронично прилагане на L-NAME. Резултатите показват, че след хронично прилагане на L-NAME пролиферацията на лимфоцитите е увеличена многократно (G2 vs G4). Данните от тази серия експерименти са представени в табл.

**Таблица 4. 1. Ефект на морфин и L-NAME върху Concanavalin A-индуцирана лимфоцитна пролиферация**

Concanavalin A (µg/ml)	Група G1	Група G2	Група G3	Група G4
<b>125</b>	2.74 ± 0.29 <sup>a</sup>	117.62 ± 14.63 <sup>a</sup>	28.84 ± 3.58	38.75 ± 3.77
<b>500</b>	2.26 ± 1.21 <sup>a</sup>	107.52 ± 9.70 <sup>a</sup>	19.11 ± 2.14	23.75 ± 1.21

<sup>a</sup> P ≤ 0.001 vs G4

Данните показват, че приложени в комбинация морфин и L-NAME не предизвикват характерните за тях ефекти на потискане, респ. увеличаване на пролиферацията лимфоцити. Комбинираното третиране не предизвиква статистически достоверни промени на лимфоцитната пролиферация в сравнение с контролните стойности (G3 vs G4).

## **5. Апоптоза / ДНК фрагментация на тимоцити**

Данните от светлинната микроскопия показват, че след хронично третиране с морфин (G1) обширни части в кортикалната зона на тимуса съдържат голям брой клетки в различен стадий на апоптоза. Резултатите от електронно-микроскопските изследвания

показват, че са настъпили значителни ултраструктурни изменения: сгърчване на клетките, кондензиране, натрупване и дезорганизация на хроматина, изразена вакуолизация на цитоплазмата, значителни разкъсвания на ядрената мембрана и фрагментация на ядрото на клетката. Данните доказват, че има тимоцити както в стадий на начална апоптоза (маргинализация на хроматина), така и в стадий на напреднала апоптоза (резидуални телца).

Хроничното комбинирано прилагане на морфин и L-NAME възпрепятства процеса на апоптоза в тимусните клетки. Данните от ултраструктурните изследвания показват, че броя на клетките в кортикалния слой на тимуса, в които се появяват апоптотични изменения е намален съществено. Наблюдават се по-слаби увреждания на хроматина и по-малка фрагментация на ядрото.

Характерни промени настъпват и в структурата на тимоцитната ДНК. Анализ на данните от гел-електрофореза изследванията показва, че след хронично третиране с морфин голямо количество геномна ДНК е с ниско молекулно тегло и в значителна степен фрагментирана. В контраст на тези ДНК увреди при хронично третиране с морфин и L-NAME се откриват малки количества ДНК с ниско молекулно тегло и значително повече нефрагментирана геномна ДНК.

## V. ОБОБЩЕНИЕ

Фармакотерапевтичен потенциал на екстракт от целина при експериментален модел на пост-климактерична остеопороза и някои основни компоненти на механизма на действие

С приложения в тези изследвания експериментален подход за предизвикване на остеопороза - подобен синдром в овариектомирани женски плъхове създадохме адекватен модел на остеопороза, която клинично се манифестира у жени в периода след климактериума. С основание може да се приеме, че патогенетичните механизми, които се разгръщат при развитието на експерименталната остеопороза са принципно аналогични на механизмите, които са въввлечени в патогенезата на деструктивните изменения в костната система при пост-климактеричната остеопороза у жени.

Получени бяха убедителни доказателства, че настъпват едновременни и паралелни изменения в трабекуларната костна микроархитектура както в епифизните, така и в метафизните сегменти на фемуралната кост. Резултатите от настоящото изследване показват, че при третираните с екстракт от *Apium* плъхове развитието на остеопороза е забавено със значително по-слабо изразена костна деструкция, верифицирана със значително подобрените параметри на BMD и BMC както и съществено подобряване на основните параметри на костната микроархитектура.

Настоящото изследване показва, че развитието на остеопороза се съпътства със значителна хипералгезия (PPT). Фармакотерапията с Genistein или екстракт от *Arrium* намалява значително болковата чувствителност на третираните животни в сравнение с контролите третирани с плацебо. Може да се допусне, че като подобрява костната структура и намалява болката екстракта от *Arrium* би представлявал фитопрепарат с реален терапевтичен потенциал при постклимактерична остеопороза, без да причинява съществени нежелани странични реакции.

*In vitro* реактивност на миометриума при експериментален модел симулиращ хормонално индуцирана дисменорея.

Използването на изолирани *in vitro* препарати от тъкани и органи ще позволи да бъдат елиминирани напълно неприятните усещания на животните, които са използвани в експериментите при условия *in vivo* и да бъдат получени повече достоверни и репродуцируеми резултати обосновахме целите на проведените от нас експерименти. Резултатите от настоящите изследвания показват, че *in vitro* сегменти от рог на утерус изолирани от плъхове с експериментално предизвикан хормонален дисбаланс, който симулира адекватно някои клинични аспекти на синдром на дисменорея при жени. Като модел е предложен и валидиран гладкомускулен *in vitro* препарат от изолиран маточен рог на плъхове, при които е предизвикан експериментален синдром на хормонален дисбаланс симулиращ най-съществените контрактилни компоненти на „дисменорея“ - подобен симптомокомплекс при жени. Този изолиран гладкомускулен

препарат позволява да бъдат квантифицирани ефектите върху спонтанната и евокирана съкратителна активност и тонуса на миоетриума при различни схеми за фармакологично повлияване. Тези възможности бяха успешно използвани за изследване на ефекта на аналгин върху тонуса и контрактилитета на миоетриума при състояние на симулиран „дисменорея“ подобен синдром.

Нитроксидергична модулация на поведенските, кардиоваскуларни и имунни отговори и мозъчната NADPH diaphorase активност при експериментални модели на опиоидна толерантност / зависимост

Проведените изследвания на интегративно, тъкънно, целуларно, субцелуларно и молекулно ниво представляват широкообхватно и комплексно проучване на Морфин-индуцираните толерантност, зависимост и абстиненция върху адекватни експериментални модели. Данните от тези изследвания доказват убедително, че блокирането на системата NOS / NO забавя развитието, намалява интензивността и възпрепятства промените в хемодинамиката при опиоид-индуцирани толерантност, зависимост и абстиненция, възникнали след хронично прилагане морфин. Разширявайки обсега на проучването и върху други области данните от настоящите изследвания показват, че блокирането на нитроксидергичните механизми може да неутрализира супресията на лимфоцитната пролиферация, апоптотичните процеси и ДНК фрагментацията, предизвикани от хроничното прилагане на морфин. В унисон с

тези изследвания са микроскопските и ултрамикроскопски данни, че хроничното третиране с морфин предизвиква силно понижаване на експресията на NADPH diaphorase в PAG, DRN, PPN, LDT, които са специфичните субкортикални структури в главния мозък ангажирани с процесирването на възходящата ноцицептивна сигнализация.

В настоящите проучвания поведенските симптоми при синдром на опиоидна толерантност / зависимост/ абстиненция са квантифицирани с новосъздадена и валидирана кумулативна скала. Използването на тази скала в експерименталната работа ще допринесе за избягване на несигурността и двусмислието при оценяване на характера и интензитета на поведенските реакции от прилаганата досега дескриптивна скала за оценка на поведението.

## VI. ИЗВОДИ

1. Разработеният модел на остеопороза в овариектомирани женски плъхове е адекватен модел на постклимактерична остеопороза у жени, обективизирано чрез проведените методи: клинични (BMD и BMC), лабораторни (промени на серумните нива на IL-6 и RANKL) и имуно-хистохимично охарактеризиране на костните промени при развитие на остеопороза.

1.1. Третирането с екстракт от *Arjium* забавя развитието на остеопороза, верифицирано с всички гореспоменати комплекси от параметри. Хроничното третиране с екстракт от *Arjium* възпрепятства развитието на тежки деструктивни изменения в костната микроархитектура.

1.2. Остеопорозата се съпровожда със значителна хипералгезия (PPT), която е отслабена при третиране с *Arjium*

1.3. Екстрактът от *Arjium* (целина) проявява много благоприятни ефекти срещу основната клинично-анатомична и параклинична симптоматика при модел на постклимактерична остеопороза и би бил ефикасно средство за профилактика на фрактури на костите, с по-малко нежелани лекарствени реакции, отколкото хормоно-заместителна терапия с естрогени.

2. Създаденият и валидиран *ex vivo/in vitro* експериментален модел на хормонално-обусловена „дисменорея“ дава възможност за количествено определяне на съкратителна

активност и тонуса на миометриума при различни схеми за фармакологично повлияване.

3. Разработена и внедрена е кумулативна скала за количествено определяне на интензивността на отделните симптоми при синдром на експериментални опиоидна толерантност, зависимост, абстиненция.

3.1. Доказано е, че ко-третирането с L-NAME отслабва абстинентните прояви и забавя развитието на толерантност към сърдечно-съдовите и аналгетични ефекти на морфин

3.2. Установено е, че третирането с L-NAME отслабва потискането на имунитета, при продължително третиране с морфин, доказано с морфин-индуцирана апоптоза и понижава броя на клетките с апоптоза, но комбинирано хронично третиране с морфин и L-NAME не се променя пролиферацията на лимфоцитите.

## VI. ПРИНОСИ

### Приноси с методологичен характер

1. Валидиран е остеопороза - подобен синдром в овариектомирани женски плъхове като адекватен модел на постклимактерична остеопороза у жени. За първи път у нас е приложен метод DEXA за изследване на изменение на костна минерална плътност (BMD) и костно минерално съдържание (BMC) при малки животни.
2. Създаден е и е валидиран експериментален модел на „*In vitro* еквивалент“ на спастична висцерална болка при хормонално симулиран дисменорея - подобен функционален синдром.
3. Създадена е нова кумулативна скала за квантифициране на интензивността на отделните симптоми при синдром на експериментални опиоидна толерантност, зависимост, абстиненция.

### Приноси с фундаментален и приложен характер

4. Третирането с екстракт от Apium или Genistein забавя развитието на остеопороза у плъхове, като Apium е с потенциала на ефикасно средство за профилактика на фрактури на костите и с по-малко нежелани лекарствени реакции.

5. Фармакотерапията с Genistein или екстракт от Apium намалява значително болковата чувствителност на третираните животни в сравнение с остеопоротичните.
6. Блокирането на системата на азотния оксид забавя развитието на толерантност към аналгетичните и хемодинамични ефекти на морфин и облекчава интензитета на абстинентните прояви на зависими към морфин плъхове.
7. Верифицирани са промените в нивата на NOS в стволони ядра на главния мозък (PAG, DRN, PPN, LDT), участващи във възходящата болкова система. Демонстрирана е потиснатата експресия на NADPH diaphorase от морфин и L-NAME.
8. Системата L-Arg-NO модулира имуносупресивния ефект на опиоидите като възпрепятства развитието на морфин-индуцирана апоптоза и алевиира ефекта на морфин върху пролиферацията на лимфоцитите.

## **VIII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

1. **Tsakova, A.**, Surcheva, S., Vlaskovska M. *Ex situ-en block* and *in vitro* animal models of mechanosensory and motor equivalents of pelvic and urogenital pain. *Biotechnol. Biotechnolog. Equip.* 27, 3987 - 3990, 2013. **(IF 0.701)**
2. **Tsakova, A.**, Surcheva, S., Simeonova, K., Altankova, I., Marinova, Ts., Usunoff, K., Vlaskovska, M. Nitroxidergic modulation of behavioral, cardiovascular and immune responses, and brain NADPH diaphorase activity upon morphine tolerance/ dependence in rats. *Biotechnol. Biotechnolog. Equip.* 29 (1), 92-100, 2015. **(IF 0.701)**
3. **Tsakova, A. P.**, Surcheva, S. K., Bankova, V. S., Popova, M. P., Peev, D. R., Popivanov, P. R., Surchev, K. L., Ratkova, M. D., Surchev, L. K., Vlaskovska, M. V. The effect of *Apium Nodiflorum* in experimental osteoporosis. *Current Pharmac. Biotechnol.* 16 (5), 414 -423, 2015. **(IF 2.690)**

## IX. УЧАСТИЯ В НАЦИОНАЛНИ И МЕЖДУНАРОДНИ КОНГРЕСИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### *Международни конгреси в чужбина*

1. **A. Tsakova**, S. Surcheva, M. Ratkova, K. Surchev, L. Kasakov, M. Vlaskovska. Metamizol could alleviate pelvic pain by analgesic and spasmolytic actions: *in vivo* and *in vitro* studies. VI European Congress of Pharmacology, 17 - 20. 07. 2012, Granada. LP011
2. Surcheva, **A. Tsakova**, K. Surchev, K. Simeonova, I. Altankova, Ts. Marinova, M. Vlaskovska. Nitroxidergic modulation of behavioural and immunological responses in morphine treated rats. VI European Congress of Pharmacology. 17 - 20. 07. 2012, Granada. LP0431.
3. **A. Tsakova**, S. Surcheva, V. Bankova, D. Peev, P. Popivanov, K. Surchev, M. Ratkova, L. Kasakov, L. Surchev, M. Vlaskovska. The effect of *Apium Nodiflorum* in experimental osteoporosis. Drug Discovery & Therapy World Congress and Global Biotechnology Congress. 16 - 19. 06. 2014, Boston. SL-169.

### *Национални конгреси с международно участие*

1. Даскалова, Д., **Пенчева, А.** Опиоидни пептиди и рецептори. Промени при опиатна зависимост. Литературни и експериментални данни. данни. АСМБ, Студентска научна сесия, 28 Май 1996, София, Резюме, стр. 32.
2. **A. Tsakova, K. Surchev, M. Ratkova, S. Surcheva, M. Vlaskovska.** Experimental studies on the mechanisms of visceral pain: Effect of Metamizol. VI Национална конференция за изследване и лечение на болката. Хисаря, 31. 05 - 02. 06. 2012. Резюме, p102.

**MEDICAL UNIVERSITY - SOFIA,  
FACULTY OF MEDICINE  
DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY**

**Ana Pencheva Tsakova, MD**

**PHARMACOLOGIC APPROACHES IN PAIN  
MANAGEMENT IN DIFFERENT EXPERIMENTAL  
MODELS: A BASIS FOR MECHANISM  
TARGETED TREATMENT**

**PhD Thesis**

**Scientific Advisors:**

**Prof. Mila Vlaskovska, MD, DMSc  
Prof. Slavina Surcheva, MD, DMSc**

**Official Reviewers:**

**Prof. Iren Beronova, MD, DMSc  
Assoc. Prof. Ivan Lambev, MD, PhD**

**Sofia • 2016**

## ANNOTATION

**Background:** The International Association of Pain (IASP) definition on pain is that it is "An unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage". Pain affects 20% of the whole population and 50% from adults has chronic pain. Pain management is a fundamental human right. Several approaches are considered – pharmacologic (analgesics, anesthetics, adjuvant treatments), non-pharmacological (surgical, physical, biophysical) and alternative methods. Still 40% of patients say it is inadequately treated. Another aspect is the problem with the related drug side effects. This understanding is reflected in the developed guidelines for the pain management (European Medicinal Agency), which are based on the pathogenetic mechanism target approach and individualized treatment. Studies on the different types of pain, mechanism, and the treatment approaches are currently of an importance.

**Objective:** The main goal of the current PhD thesis is to optimize the analgesic effect of synthetic and plant products and investigate approaches to reduce the drug side effects related to treatment of pain. It is focused on: 1. development of two experimental models of hormonal-induced pain (somatic model of pain in osteoporosis and visceral model in dysmenorrhea), to address different pathogenetic treatment approach; 2. To reveal the role of NOS/NO pathway in the modulation of morphine-induced *in vivo* and *in vitro* responses of morphine tolerance, dependence/withdrawal revealed by several behavioural and cardiovascular symptoms, *in vitro* lymphocyte proliferation and thymocyte apoptosis/DNA fragmentation. The different types of investigation are presented as concrete objective.

**Methods:** Female and male Wistar rats were used for all experiments. The experimental protocols were approved by the Ethics Committee of the Medical University Sofia. *In vivo* methods: Postmenopausal osteoporosis model, in which bone mineral density (BMD) was measured by dual energy X-ray absorptiometry (DEXA), using a computer program for small subjects (Small Animal Rat WB) six months after ovariectomy and 8 weeks after treatment with extract of Apium and Genistein; Changes in pain threshold were assessed with Plantar heat test; Hind paw pressure test, Carrageenan-induced edema and pletysmometry. Model of opioid-induced tolerance and dependence with innovative behavior scale for quantifying symptoms of tolerance/dependence and abstinence which measures: Blood pressure and heart rate changes; *In vivo /Ex vivo* model of "dysmenorrhea". *Ex vivo* isolation of uterine horn. *In vitro* methods: Electrical and PGE2 stimulation of isolated uterine horn; Rats fibula and tibia densitometry; Histomorphological and histometric analysis of bone changes; Levels of RANKL (NF- $\kappa$ B) and IL-6 as a marker for inflammation and osteoporosis (ELISA methods in serum); Concanavalin A - induced lymphocyte proliferation in experimental opioid tolerance / dependence; NO-synthase activity in certain brain nuclei (Expression of neuronal NADPH diaphorase) in experimental opioid tolerance / dependence model; Thymocyte apoptosis and DNA fragmentation in experimental opioid tolerance / dependence model.

**Results:** Long term supplementation of Apium extract retarded the progression of osteoporosis to a similar degree as did Genistein. Apium showed a positive effect on osteoporotic bones and increased BMD (vs OVX). It was found that BMD and mechanical hyperalgesia thresholds decreased in OVX rats. Development of mechanical hyperalgesia was prevented by Apium extract or Genistein. They also enhance the analgesic action of metamizol or ibuprofen in experimental inflammatory reaction. Developed and validated is an *in vitro* rat model resembling uterine contractions in conditions of hormonal stimulation of dysmenorrhea. The results showed that metamizol suppress the spontaneous, as well as the electrical field stimulation evoked and PGF2 $\alpha$ -induced contractions of isolated uterine horn. The present research showed that chronic co-administration of NOS inhibitor L-NAME was able to retard the development of opioid tolerance/dependence, to attenuate significantly naloxone-precipitated withdrawal syndrome and to prevent the tolerance to the cardiovascular action of morphine. In addition, the symptoms of morphine tolerance, dependence and withdrawal were quantified for the first time by a novel score-point scale. This methodology proved very useful in avoiding the ambiguity of descriptive evaluation of the behavioral symptoms. The apoptotic process was very much restricted by L-NAME supplementation of chronic morphine treatment, which resulted in few apoptotic cells.

**Conclusions:** The created model of postmenopausal osteoporosis has proven to be adequate. The results proves the beneficial effects of Apium extract and Genistein on mechanical pain thresholds in experimental model of post-menopausal osteoporosis. The present study shows that administration of Apium extract can retard/reverse the development of osteoporosis and decrease the related hyperalgesia. Findings on the modulation of NOS/NO pathway reveal that chronic co-administration of L-NAME has positive effect on the development of opioid tolerance/dependence, significant attenuation of naloxone-precipitated withdrawal syndrome and prevention of tolerance to the cardiovascular action of morphine.

**Keywords:** osteoporosis, dysmenorrhea, pain thresholds, morphine tolerance/dependence, Apium extract, Genistein