

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**



*Дисертационен труд за придобиване
на образователна и научна степен
„доктор по медицина”*

Направление 7: Здравеопазване и спорт
Професионално направление: 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

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ	5
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	8
1. Болка.....	8
1.1. Видове болка.....	9
2. Ноцицепция и ноцицептивна система	11
2.1. Периферни ноцицептори	11
2.2. Ноцицептивни аферентни пътища и ядра в ЦНС	13
2.2.1. Гръбначен мозък.....	13
2.2.2. Таламус	15
2.2.3. Церебрален кортекс	17
2.3. Трансмитери, медиатори, рецептори в ноцицептивната система	18
3. Антиноцицепция и антиноцицептивна система	21
3.1. Антиноцицептивни еферентни пътища и ядра в ЦНС	21
3.2. Трансмитери, медиатори, рецептори в антиноцицептивната система	25
4. Фармакотерапия на болката	26
4.1. Нестероидни противовъзпалителни средства. Неопиоидни аналгетици	26
4.2. Опиоидни (наркотични) аналгетици	37
5. Опиоидни толерантност, зависимост, абстиненция.....	44
5.1. Нитроксидергична модулация	54
5.2. Нитроксидергични процеси и целуларен имунитет	55
5.3. Нитроксидергични процеси и опиоидна толерантност /зависимост	56
6. Дисменорея. Болков синдром	58
6.1. Патофизиологични механизми	59
6.2. Фармакотерапия	61
7. Остеопороза	62
7.1. Патофизиологични механизми	64
7.2. Фармакотерапия	68
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	74

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	77
1. Експериментални животни.....	77
2. „Поведенски“ модел на експериментална опиоидна толерантност / зависимост	77
3. „Кардиоваскуларен“ модел на експериментална опиоидна толерантност/ зависимост	81
4. Concanavalin A-индуцирана лимфоцитна пролиферация	82
5. Апоптоза/ДНК фрагментация на тимоцити	83
6. Експресия на невронална NADPH diaphorase (NO-синтаза)	84
7. „In vitro еквивалент“ на спастична висцерална болка дисменорея- подобен функционален модел in vivo.....	85
8. Модел на експериментална остеопороза	86
9. Фитохимични методи за изолиране, пречистване и верификация на екстракт от <i>Apium nodiflorum</i>	87
10.Остеодензитометрични методи при остеопороза	87
11.ELISA методи за определяне на IL-6 и RANKL (NF-κB) в серум	88
12.Методи за изследване на ноцицепция	88
13.Методи за хистоморфологично и хистометрично изследване на кости	90
14.Методи за статистически анализ	91
V. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РЕЗУЛТАТИ	92
1. „In vitro еквивалент“ на спастична висцерална болка при дисменорея - подобен модел: Ефект на PG F2α и Аналгин (metamizol)	92
1.1. Евокирани миогенни контракции	92
1.2. Спонтанни контракции	93
2. Ефекти на екстракт от <i>Apium nodiflorum</i> и Genistein при модел на остеопороза	96
2.1. Динамични промени на телесната маса	96
2.2. Динамични промени на костната плътност (BMD).....	97
2.3. Динамични промени на костната микроархитектура	99
2.4. Динамични промени на серумните нива RANKL и IL-6.....	102
2.5. Динамични промени на ноцицептивните прагове.....	103
3. Ефект на Аналгин (Metamizol) върху инфламаторната болка при експериментална остеопороза с екстракт на <i>Apium</i> или Genistein.....	104
4. Нитроксидергична модулация на опиоидната толерантност / зависимост	105

4.1. Модулация на поведенските реакции.....	105
4.2. Модулация на сърдечно-съдовата дейност	108
4.3. Concanavalin A-индуцирана лимфоцитна пролиферация	110
4.4. Апоптоза / ДНК фрагментация на тимоцити.....	111
4.5. NADPH diaphorase активност в стволовите ядра на главния мозък	113
VI. АНАЛИЗ И ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИ	116
VII. ОБОБЩЕНИЕ	130
VIII. ИЗВОДИ	132
IX. ПРИНОСИ	134
X. ЛИТЕРАТУРА	136
XI. ПРИЛОЖЕНИЕ	151

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AA	Арахидонова киселина
AP-1	Activator protein 1
АТФ	Аденозинтрифосфат
ВМС	Костно минерално съдържание
BMD	Костна минерална плътност
НЛР	Нежелани лекарствени реакции
НСПВС	Нестероидни противовъзпалителни средства
cAMP	Цикличен аденозинмонофосфат
COX	Циклооксигеназа
CREB	Cyclic AMP response binding element
DEXA	Dual energy X-ray absorbtometry
DPM	Disintegrations per minute
DRN	Dorsal raphe nucleus
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER- α	Естрогенен рецептор α
HR	Пулсова честота
HRT	Хормон-заместваща терапия
IL	Интерлевкин
L-Arg-NO	L-аргинин NO (nitric oxide)
LC	Locus coeruleus
LDT	Laterodorsal tegmental nucleus
LT E4	Leucotriene E4
mGluR	Метаботропни глутаматни рецептори
MFS-1	Миотропна електрическа стимулация
NADPH-diaphorase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase
NRM	Nucleus raphe magnus
NMDA	N methyl-D-aspartate
NO	Nitric oxide (азотен оксид)
NOS	Азотоксидна синтаза
OPG	Osteoprotegerin
OVX	Ovariectomized
PAG	Grisea periaqueducti mesencephali
PB	Фосфатен буфер
PET	Positron emission tomography
PG	Простагландини
PKA	Protein kinase A
PPN	Pedunculopontine tegmental nucleus
PPT	Paw pressure test
RANK	Рецептор за активиране на нуклеарния фактор NF- κ B
RANKL	Ендогенен лиганд на този рецептор
PHT	Plantar heat test
SRT	Спиноретикуларен път
STT	Спиноталамичен път
TH	Тирозинхидроксилаза
TNF- α	Тумор-некротизиращ фактор
TXA	Тромбоксани
VTA	Вентрален тегментум

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“ (Merskey, H., Bogduk, N., 1994). 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. По литературни данни 20 % от всички хора и 50 % от възрастното население страдат от хронични болки. Заради хронична болка 61 % от лицата са с намалена работоспособност, 19 % са загубили работата си, 21 % изпадат в депресия. Над 40 % от тях съобщават, че лечението им е било неадекватно (Breivik, H., 2005). Острата болка предизвиква 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). 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. Хроничната болка може да предизвика сериозни соматични, поведенчески и / или психологични нарушения, които се проявяват в разстройства на съня, намалена работоспособност, депресивни симптоми, влошено качество на живот. 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 (Merskey, H., Bogduk, N., 2004). В медицинската общественост се застъпва становището, че хроничната болка е заболяване (Niv. D., Devor, M., 2004). 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. 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. Лечението на болката при остеопороза или болката при метастази в костите изисква прилагането на лекарствени продукти, които забавят остеолизата напр. бисфосфонати, денозумаб, суплементирани със симптоматично действащи аналгетични лекарства.

Разходите за здравни грижи и лечение на острата и хронична болка в страните на ЕС възлизат на повече от 40 милиарда евро и са над 150 милиарда долара в САЩ. Към това се прибавя влошеното качество на живот на пациентите и техните семейства. Неотдавна 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. Проблема за нежеланите реакции от прилагането на лекарствени продукти и особено аналгетици, е във фокуса на превантивните действия на Европейската Агенция 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 нестероидните противовъзпалителни средства (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.

Злоупотребата с опиоиди се превръща в световен проблем, тъй като възрастовата граница слиза все по-надолу, а опиоидната зависимост се определя вече като "хронична, рецидивираща мозъчна болест".

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 поведенски промени при развитие на зависимост към морфин с блокиране на азотно-окисната синтаза (NOS) чрез прилагането на специфичен инхибитор.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. БОЛКА

Болката е динамичен комплекс от сензорни, когнитивни и емоционални възприятия. Тя представлява аверзивен сигнал за реално или потенциално увреждане на организма. В еволюционен аспект болката е неизбежна последица на живота (Macfarlane, G. J. et al., 2006). Съгласно дефиницията на IASP (Международна Асоциация за Изследване на Болката) болката е „неприятно сензорно и емоционално преживяване, свързано с реално или потенциално увреждане на тъкани“ (Merskey, H., Bogduk, N., 1994). Клинично болката има характер на алармиращ симптом в голям брой соматични или висцерални аллогенни синдроми, които се наблюдават се всички възрасти, но са по-чести при жените (Macfarlane, G. J. et al., 2006). В последно време се лансира становището, че болката може да бъде третирана като не като симптом, а като самостоятелно заболяване (Niv, D., Devor, M., 2004). Редица ретроспективни проучвания (Табл. 1. 0) показват, че 10 - 13 % от хората на възраст между 18 и 75 години страдат от различни болкови синдроми. При младите индивиди по-честа е абдоминалната болка, при хората на средна възраст по-честа е орофациалната болка и при възрастните индивиди по-честа е мускулно-скелетната и ревматоидна болка (Macfarlane, G. J. et al., 2006).

**Таблица 1. 0. Епидемиологична тежест (%) на хроничната болка (фибромиалгия)
(Модифицирана по Macfarlane, G. J. et al., 2006)**

Страна, година	Анкетирани лица	Възрастов диапазон	Лица с болка (%)
Англия, 1995	1340	18 - 85	11.2
САЩ, 1995	3006	18 - 80 ⁺	10.6
Канада, 1999	3395	18 - 75 ⁺	7.3
Англия, 1999	1953	18 - 65	12.9
Швеция, 2001	2425	24 - 70	11.4
Германия, 2003	2253	35 - 74	13.5

1.1 Видове болка

Тривиален подход в клиниката е болката да бъде квалифицирана като остра или хронична с цел да бъде оптимизиран диагностично-терапевтичния план при третирането на пациенти с изразен болков синдром. Острата болка се проявява предимно след травма (механична, термична, химична) и/или увреждане (исхемия, спазми) на тъканите. Интензивността на болката е голяма в началото и постепенно намалява. Хроничната болка често има неизяснена етиопатогенеза, непредвидима продължителност, различена интензивност и трудно лечение. Основни характеристики на остра и хронична болка са сумирани в табл. 1. 1.

Таблица 1. 1. Основни характеристики на остра и хронична болка

Остра болка	Хронична болка
Ясни причинно-следствени връзки	Неясни многообразни причини
Точно начало	Неясно начало
Кратка прогнозируема продължителност	Голяма (над 3 мес) продължителност
Интензивността корелира с оздравяването	Често представлява симптом / диагноза
Представлява защитна реакция	Съчетава се с когнитивни прояви
Лечението е ефективно	Лечението е трудно и продължително

Според етиологията болката може да бъде адаптивна, малигнена, хирургична. Откриването на причината на болката е от първостепенно значение за индивидуализиране на терапията и прогнозата. Според настъпилите функционални или структурни изменения в нервната система болката се квалифицира като ноцицептивна, невропатна или смесена. Ноцицептивната болка е соматична или висцерална и е предизвикана от различни нокси като травматични, хирургични, лъчеви, механични или болестни увреди. Характерно за ноцицептивната болка е увреждане на тъканите, активиране на периферните ноцицептори, интактна соматосензорна система, локална възпалителна реакция и освобождаване на множество ноцицептивни медиатори. Интензивността на ноцицептивната

болка е значителна и обикновено се засилва след първото денонощие. Вид ноцицептивна болка е болката при възпаление. Невропатната болка се появява при трайни морфологични промени в соматосензорната система в резултат на различни травматични или болестни нокси (Oakley, J. C., 2003) и се манифестира с проявена функционална дисфункция на нервната система (Fields, H. L., 1987). Невропатната болка може да бъде периферна или централна. Характерно за периферната невропатна болка е увреждане на периферните отдели на соматосензорната система и едновременната поява на сензорен дефицит и хипералгезия в засегнатия кожен дерматом. Централната невропатна болка може да бъде индуцирана при увреди в централните отдели на соматосензорната система от различни патологични процеси придружена от разнообразна аверзивна симптоматика (Woolf, C. J., Mannion, R. J., 1999). Типична невропатна болка се наблюдава при диабетна полиневропатия или херпес зостер. Смесен тип болка може да настъпи при съчетаване на изменения в периферните и централните структури на соматосензорната система. Болковият синдром в тези случаи се характеризира с ноцицептивни и невропатни особености. Алодинията е болка провокирана от стимули, които не са алгоненни. За разлика от хипералгезията при алодинията има структурна увреда на соматосензорната система. Настъпва качествена промяна на възприятието и модалността на сетивните усещания, при която има перверзно възприятие на болката и приятни усещания за лек допир, топло или хладно предизвикват значителна болка. Алодинията е клинична терминология и не дешифрира специфични патофизиологични механизми.

2. НОЦИЦЕПЦИЯ И НОЦИЦЕПТИВНА СИСТЕМА

Терминът *ноцицепция* означава трансформиране на енергията на алгогенното дразнене в спайкова активност на сетивните аферентни нервни влакна и пропагиране на генерираните ноцицептивни биопотенциали до центровете за болка ЦНС. Това се осъществява в каскада от процеси на трансдукция, трансмисия, модулация и перцепция на ноцицептивната сигнализация. При трансдукция енергията на алгогенния стимул предизвиква деполяризация на ноцицептора и генериране на спайкови потенциали в сетивния терминал. При трансмисия спайковата активност се провежда до съответните центрове в ЦНС. При модулация ноцицептивните сигнали се потенцират или инхибират на различни нива в ЦНС. При перцепция във висшите отдели на ЦНС се извършва комплексна интеграция на постъпилата ноцицептивна сигнализация. В този контекст терминът *болка* означава комплексно преработване във висшите отдели на ЦНС на ноцицептивната информация като аверзивно физическо и емоционално възприятие. Анатомичен субстрат за тези процеси са специализирани соматосензорни структури на периферната и централна нервна система, интегрирани в т. н. ноцицептивна система.

2.1 Периферни ноцицептори

Механични, физични, химични или възпалителни дразнения, които сигнализират за потенциално или реално увреждане на тъканта активират болковите рецептори (ноцицептори). Клетъчните тела на сетивните аференти са разположени в спиналните и тригеминусните ганглии. Аксоните им образуват сетивни аферентни влакна, които се включват в соматичните и автономни нерви и така достигат до всички повърхностни и дълбоки тъкани и органи. По крайните арборизации на сетивните фибри са разположени ноцицептори, представляващи специализирани рецептори, които свързват селективно екстрацелуларно освободени ендогенни

(тахикини, хистамин, серотонин, АТР, пептиди, простагландини) или екзогенно попаднали (капсицин, хипертонични разтвори) химични субстанции, детектират температурни промени (топло или студено), хипоксия (рН, К⁺) или реагират на деформации (натиск и допир). Възникналите спайк-потенциали пропагират (трасмисия) по ноцицептивните аферентни влакна до ЦНС. Информацията за потенциално или реално увреждане на организма, т. е. алгогенното дразнене, се предава от ноцицептора до гръбначния стълб по три типа аферентни влакна. Миелинизираните Аβ нервни влакна имат висока скорост на провеждане на неболкови сигнали като вибрация, движение и лек допир. При стимулацията на тези влакна се активират спинални инхибиторни интерневрони в *substantia gelatinosa* на задния рог, които имат потенциален болка - модулиращ ефект. Този механизъм е един от основните компоненти на т. н. теория за *gate control* на ноцицепцията (Melzack, R., Wall, P. D., 1965). Миелинизираните Аδ нервни влакна имат висока скорост на провеждане на сигнали за бърза, остра, пробуждаща болка, описвана като „first pain“. Тези влакна са главната част миелинизираните нервни влакна и осигуряват бързи локализация на острата болка и защитен рефлекс. Разделят се на Аδ1, които са механоцептори, активирани от интензивни потенциално опасни механични стимули и Аδ2, които са полимодални ноцицептори, активирани от механични, термични и химични стимули. Немиелинизираните С нервни влакна имат ниска скорост на провеждане на сигнали за тъпа, пареща, дифузна болка, описвана като „second pain“. Тези влакна са 75 % от всички сетивни аференти и по тях могат да пропагират и някои неболкови дразнения (пруритус). Висцералните ноцицептори са пълен аналог на соматосензорните ноцицептори и сигнализират за висцерална болка. Аδ и С фибри инервират перитонеума и коремните кухина, плевралната кухина, жлъчните пътища, тестисите, менингите и вътрешните части на ухото и окото. Висцералната сензорна мрежа е много комплицирана поради

включването в нея на симпатиковите, вагусовите и интрамурални нерви. Тази система може да функционира относително автономно и заедно с висшите отдели на ЦНС образува т. н. *gut - brain axis*. Втората особеност на висцералната болка е, че може да се проектира в различни дерматомни зони на соматосензорната ноцицептивна система. Този факт е аксиома в клиниката и играе важна роля както за началната диагноза, така и за диференциалната диагноза. Основните характеристики на сетивните аферентни влакна са представени в табл. 2. 1.

Таблица 2. 1. Структурни и функционални параметри на ноцицептивните влакна

	Aβ	Aδ	C
Диаметър (μm)	6 - 12	1 – 5	0.2 - 1.5
Миелинизация	+	+	-
Провеждане (m/s)	35 - 75	5 – 30	0.5 – 2
Функция	Лек допир, проприоцепция	Температура, Ноцицепция (механична, термична)	Ноцицепция (механична, термична, химична)

2.2 Ноцицептивни аферентни пътища и ядра в ЦНС

Алгогенните дразнения ще бъдат възприети като болка когато ноцицептивните сигнали от периферията достигнат сетивните центрове за болка във висшите отдели на ЦНС.

2.2.1 Гръбначен мозък

Ноцицептивните аференти са първите неврони на каскадата, по която пропагират болковите сигнали. Те навлизат в задните рога на гръбначния мозък и синапсират с вторите центрипеталени неврони на ноцицептивната каскада в *substantia grisea*, в която хистологично се откриват десет зони

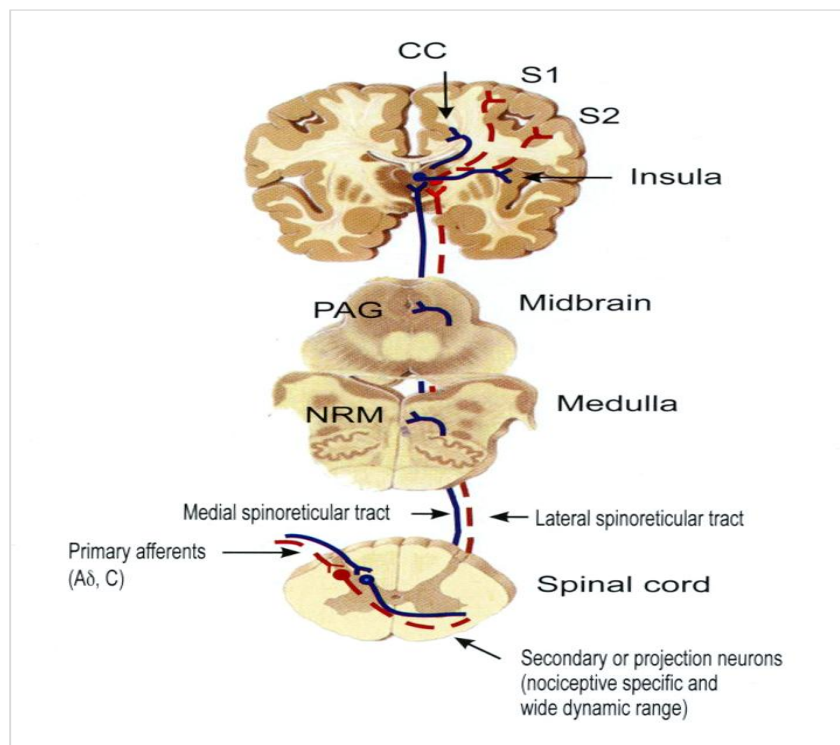
(laminae). A δ и C влакната образуват синапси с невроните в ламини I, II, IV-VI, VII, VIII. Аксоните на секундерите неврони преминават контралатерално и асцендират до хипоталамуса по спиноталамичния (STT), ретикуларната формация по спиноретикуларния (SRT) и стволите ядра tectum, substantia grisea periaqueducti mesencephali (PAG) и nucleus raphe magnus (NRM) по спиномезенцефалния (SME) път. Невроните от тази група се подразделят на (i) специфични ноцицептивни неврони, които синапсират с A δ и A δ / C влакна, и (ii) неврони с широк динамичен обхват (WDR), които синапсират с A δ / C и A β влакна (Terman et al., 2001) и играят важна роля в хронифицирането на острата болка (Bars, L. D., 2002). Невроните на STT имат малки рецептивни полета с добро соматотропно представителство и завършват в латералното и вентралното задно ядра на вентробазалния таламус. Те образуват *латерален сноп*, по който се транслират ноцицептивни и термични сигнали и *преден сноп*, по който се транслират тактилни сигнали. Невроните на SRT имат по-широки рецептивни полета и завършват в медиалните ядра на таламуса. Една част от тези неврони синапсират в стволите ядра PAG и NRM, които играят много важна роля в процесите отговорни за модулирането и емционалния ъпгрейд на болката (Willis, W. D., 1985). Невроналната пластичност е забележително качество на ЦНС. Тя позволява продължително повтарящо се активиране на C влакната да предизвиква промени в йонната проницаемост на мембраната, т. е. на биоелектричните характеристики на невроните в гръбначния мозък, с които образуват синапси. Тези промени предизвикват засилване на спайковата активност на невроните, т. е. процес известен като *wind up* (Woolf, C. J., 1996), и възникване на централна сенситизация, при която усещането за болка от алгогенно дръзнене със същата интензивност е засилено. Централна сензитизация може да настъпи при транскрипционни промени в експресията на бързи *c-fos* и *c-jun* гени, предизвикани от продължително активиране на глутаматните рецептори в гръбначния мозък.

Невроналната пластичност, която е предпоставка за понижаване на ноцицептивните прагове или засилване на спайковата активност на невроните в гръбначния мозък е основен механизъм за развитие на хипералгезия или алодиния (Woolf, C. J., Salter, M. W., 2006). Пластичността е в основата на процес на т. н. *време-сумиране* на алгогенните дразнения. Това се дължи на по-ниската скорост на провеждане на сигналите по С влакната, при което на фона на високочестотни стимули (хипералгезия) се наслагват и нискочестотни стимули (алодиния). При това сумиране интензивността на second pain нараства, но интензивността на first pain остава непроменена (Vierck, C. J. et al., 1997). Този феномен е характерен за WDR невроните и има глутамат/ NMDA рецепторен контрол (Eide, P. K., 2000). Друг феномен на сумиране е т. н. *пространствено сумиране*, т. е. алгогенно дразнене от по-обширна зона ще активира повече ноцицептори и ще предизвика по-силно усещане на болката. Трябва да се има предвид, че при увеличаване на територията на болката могат да се активират и инхибиторни механизми, което да предизвика парадоксална реакция, т. е. намаляване на интензитета на болката (Marchand, S., Arsenault, P., 2002). Описаните процеси имат съществено значение за разбиране на механизмите за хронифициране на болката.

2.2.2 Таламус

Таламичните ноцицептивни неврони са локализирани в двете задни вентробазални ядра вентро-латерално (ЗВЛ) и вентро-медиално (ЗВМ) и центромедиалното интраламинарно (ИЛ) ядро. Аксоните на вторите неврони на ноцицептивната каскада, обединени в СТП, са разпределени в неоспиноталамичен и палеоспиноталамичен път. Аксоните на първия път (Аδ влакна) провеждат сигнали за остра точно локализирана болка и образуват синапси във вентробазалните ядра на таламуса с третите неврони на ноцицептивната каскада. Невроните на вентробазалния комплекс

проектират в първичната и вторична соматосензорна кора (S1 и S2). Аксоните на втория път (С влакна) провеждат сигнали за дифузна болка и образуват синапси с вентромедиалните ядра на таламуса с третите неврони на ноцицептивната каскада. Една част от С влакната синапсира с неврони в ствола и ретикуларната формация. Аксоните на вторите неврони обединени в СРП са част от *lemniscus medialis* на ствола и образуват синапси в различни части на ретикуларната формация. Видно е, че в ранния етап от възприемането на болката в таламуса се интегрират ноцицептивни и емоционални компоненти. Наред с това таламуса играе роля при хронифициране на болката. Има клинични наблюдения, че при стимулация на определени таламични ядра пациентите възстановяват сензорните и ефективни компоненти на болка, която са изпитвали и е преминала преди много време. Това е доказателство, че в таламуса се запазва информация на предишни инциденти на болка, която може да бъде потисната от инхибиторни интерневрони (Lenz, F. A. et al., 1995). Локализирана увреда в таламуса (инсулт) може да разрушат тоничната инхибиторна система и демаскират ноцицептивната активност в таламуса. В клиниката този феномен е познато като *синдром на таламичната болка* (Marchand, S., 2010). Схемата на спиналните и супраспинални пътища и ядра на ноцицепцията е представена на Фиг. 2. 1. До неотдавна всички изследвания за механизмите на болката конвергираха само върху активността на невроните и пренебрегваха изцяло ролята на глията в ноцицепцията. Напоследък се съобщават данни, че при нормални условия астроцитите и микроглията имат малко значение за болковото възприятие. Когато обаче има увреждане глиалните клетки в задния рог се активират, което съвпада с развитието на невропатна болка (Tsuda, M. et al., 2005). Отдавна е известно, че от микроглията се секретират многобройни проноцицептивни фактори, действащи посредством многобройни цитокини (Suter, M. R., 2007).



ACC cortex cingularis anterior, PAG substantia grisea periaqueducti mesencephalic,
NRM nucleus raphe magnus

**Фигура 2. 1. Спинални и супраспинални ноцицептивни пътища и ядра
(Цитирана по Marchand, S., 2010)**

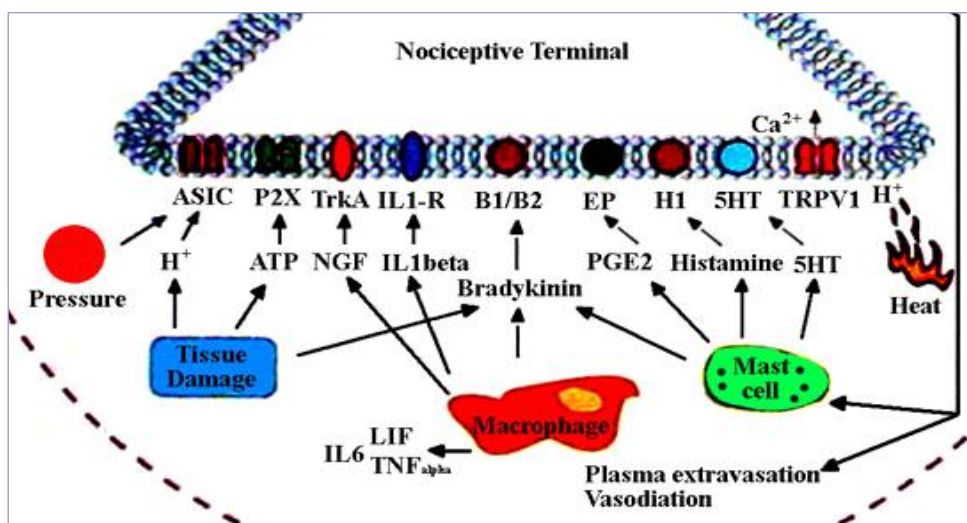
2.2.3 Церебрален кортекс

В кортекса на предния мозък са верифицирани четири структури, специализирани в обработването на ноцицептивната информация: (i) първичен соматосензорен кортекс (S1) в gyrus parietalis postcentralis, (ii) вторичен соматосензорен кортекс (S2) в operculum parietale, (iii) cortex cingularis anterior, (iv) cortex insularis fronto-temporalis. S1 и S2 са структури ангажирани с дискриминативните сензорни аспекти на болката, а следващите две зони са ангажирани с афективните компоненти на болката (Coghill, R. C. et al., 1994, Wiech, K. et al., 2008). Пре-фронталния кортекс има най-важно значение в перцепцията и модулацията на болката. Най-съществена за модулацията на болката е ролята на дорзо-латералния пре-фронтален кортекс. Има доказателства, че увеличената активност на тази зона кореспондира с намалено възприемане на болката, изразено главно

като намалено внимание към болката (Arkarian, A. V. et al., 2004, Lorenz, J. et al., 2003). Цитираните клинични и експериментални данни показват, че усещането на болка е комплексно възприятие със сетивни, когнитивни и емоционални компоненти, което се моделира активно от предишния опит на индивида.

2.3 Трансмитери, медиатори, рецептори в ноцицептивната система

Първото събитие в поредицата от процеси, които интегрирани в ноцицептивна каскада ще се възприемат като болково усещане, е генерирането на възбудни рецепторни потенциали, които пропагират в сетивните аферентни нерви до ЦНС (Willis, W. D., Jr., 1996). Трансформирането на енергията на алгогенните стимули в биоелектрични потенциали е резултат от стимул-индуцирана екстрацелуларна секреция на различни ендогенни (трансмитери) или екзогенни субстанции, които могат да се свържат със специфични рецептори, локализирани по свободните терминали на сетивните аференти (Фиг. 2. 2).

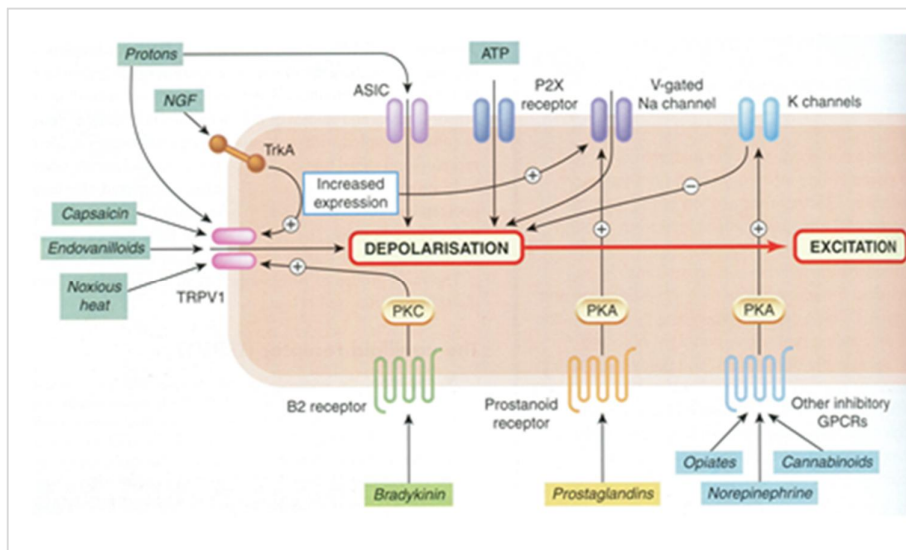


ASIC ванилоидни рецептори, чувствителни за протони, P2X пуринергични рецептори, TrkA тирозин киназа A, IL1-R интерлевкин 1 рецептор, B1,2R брадикинин 1, 2 рецептор; EP простагландин E₂ рецептор, H1 хистамин 1 рецептор, 5HT серотонин рецептор, NGF нервен растежен фактор; TRPV1 ванилоидни рецептори за натиск и температура,

Фигура 2. 2. Рецептори и медиатори експресирани в ноцицептивните нервни терминали

Ноцицепторите са убиквитерно разположени в кожата и лигавиците, синовиалните обвивки, мускулните фасции и периоста, плеврата и перикарда, менингите, артериалните стени, зъбната пулпа, перитонеума и вътрешните органи. При термично, механично или химично (вкл. хиперосмотични разтвори) въздействия с надпрагова интензивност или при тъкълни наранявания мастоцитите освобождават хистамин, тромбоцитите 5-НТ, епителните клетки АТР, миоцитите брадикинин, VIP, K⁺. При възпалителни реакции в тъканите се натрупват многобройни инфламаторни медиатори (простагландини, хистамин, тахикини) и се повишава нивото на H⁺ в екстрацелуларното пространство. При спазъм или дилатация на кухи вътрешни органи или артериални кръвоносни съдове от ендотелните клетки се освобождават екстремни количества АТР. При алгогенни дразнения от целуларните мембрани се отделят новосинтезирани простагландини. Сетивните терминали притежават различни специфични рецептори, които свързват селективно един или няколко трансмитери. Освободените субстанции могат действат като трансмитери и да инициират възбудни ноцицептивни потенциали или като модулатори, т. е. да засилват (сензитизират) или намаляват (десензитизират) чувствителността на рецепторите (Julius, D., Basbaum, A. I., 2001). Установено е, че ноцицепторите експресират рецептори за АТР (P₂X₂₋₃), bradykinin, capsaicin, histamine, 5-НТ, substance P.

Симплифицирана схема на механизмите за генериране и модулация на възбудни рецепторни потенциали в ноцицепторите е представена на Фиг. 2.3.



Фигура 2. 3. Целуларни механизми на генериране и модулация на възбудни рецепторни потенциали в ноцицепторите (Цитирана по Rang, H. P. et al., 2007)

Генерираните биопотенциали пропагират до първия ноцицептивен неврон в substantia gelatinosa на гръбначния мозък, втория ноцицептивен неврон в таламуса и третия ноцицептивен неврон в префронталния кортекс. Принципен невротрансмитер в синапсите между асцендентните ноцицептивни неврони на тези нива е глутамат, който се свързва с глутаматергични NMDA, AMPA или kainite рецептори (Conn, P. J., 2003). AMPA и kainite рецептори медираат процеси на бърза деполаризация, докато NMDA рецептори медираат процеси на синаптична пластиност (Molinoff, P. W., 2011). Част асцендиращи глутаматергични неврони синапсират с допаминергични неврони в диенцефалните ядра на ноцицептивната система, които детерминират аверзивните компоненти на болката (Windhorst, U., 1996). Продължителни алгогенни стимули могат да активират ревербериращи ноцицептивни кръгове, което е предпоставка за появата на невропатна болка. Активността на асцендиращите ноцицептивни неврони се повлиява от перисинапсно освободени простагландини, NO, невропептиди, Ca^{++} йони. Тези ендогенни модулатори сенсibiliзират глутамат-ергичните рецептори и могат да предизвикат централна

сензитизация на различни нива в ЦНС. Резонно е да приемем, че в аферентната ноцицептивна система са рекрутирани разнородни невронални мрежи с дифузни представителства в ЦНС, които контролират голям брой други жизнено важни реакции на организма. Това вероятно би могло да обясни защо болката може да бъде потушена по-ефикасно с активиране на механизми в десцендиращата антиноцицептивна система, отколкото с инхибиране на механизми в асцендиращата ноцицептивна система.

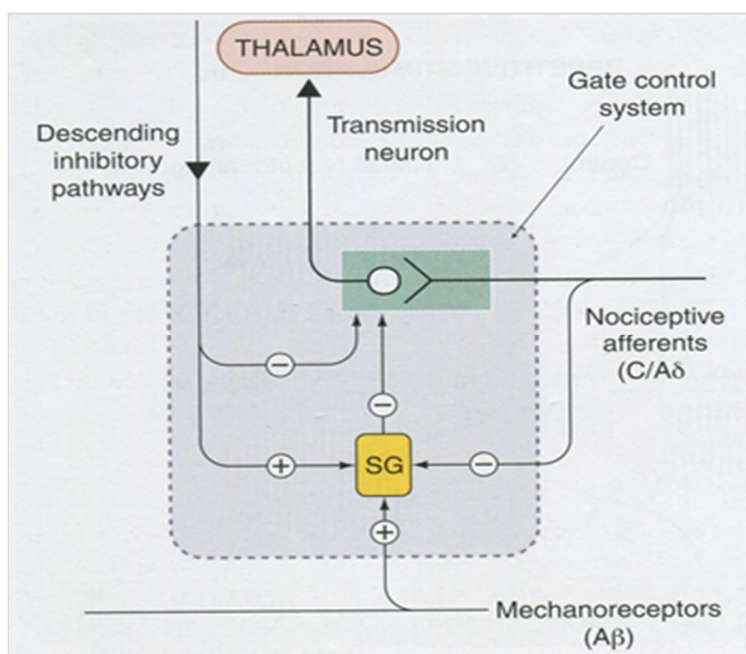
3. АНТИНОЦИЦЕПЦИЯ И АНТИНОЦИЦЕПТИВНА СИСТЕМА

Възприятието за болка, преди всичко, хронична болка, зависи от различни ендогенни и екзогенни фактори и това предполага, че характера и интензивността на болката могат да се променят във времето. Модулацията на болката започва от периферията и продължава до висшите структури на ЦНС. В ядрата на мозъчния ствол, таламуса, диенцефалона и кората на големите полукълба сензорната, когнитивна и емоционална сигнализация се интегрира в болково възприятие (Heinricher, M. M. et al., 2009).

3.1 Антиноцицептивни еферентни пътища и ядра в ЦНС

Модулация на ноцицепцията се осъществява от функционално йерархизирани механизми, реализирани в различни анатомични структури на ЦНС, които са разположени на три асцендентни нива: спинални инхибиторни механизми, които причиняват локализирана аналгезия, диенцефални и стволни инхибиторни механизми, които причиняват дифузна аналгезия и кортикални механизми, които модулират и интерпретират ноцицептивната информация (Fields, H. L. et al., 2006). Механизмите на спинална модулация на ноцицепцията се описват най-добре от теорията за т. н. *gate control* (Melzack, R., Wall, P. D., 1965). Централна роля в процеса на спинална модулация изпълняват пептидергични (енкефалини) и GABA-ергични асоциативни неврони в

substantia gelatinosa на задните рога на гръбначния мозък, които образуват централни синапси във възходящо и низходящо направление и инхибират активността на вторичните неврони. Върху асоциативните неврони конвергират ексцитаторни аферентни А β механоцепторни и еферентни диенцефални влакна, като по този начин може да бъде осъществена модулация на ноцицепцията по принципа на *обратна връзка*. В схематизиран вид тези взаимоотношения са представени на Фиг. 3. 1.



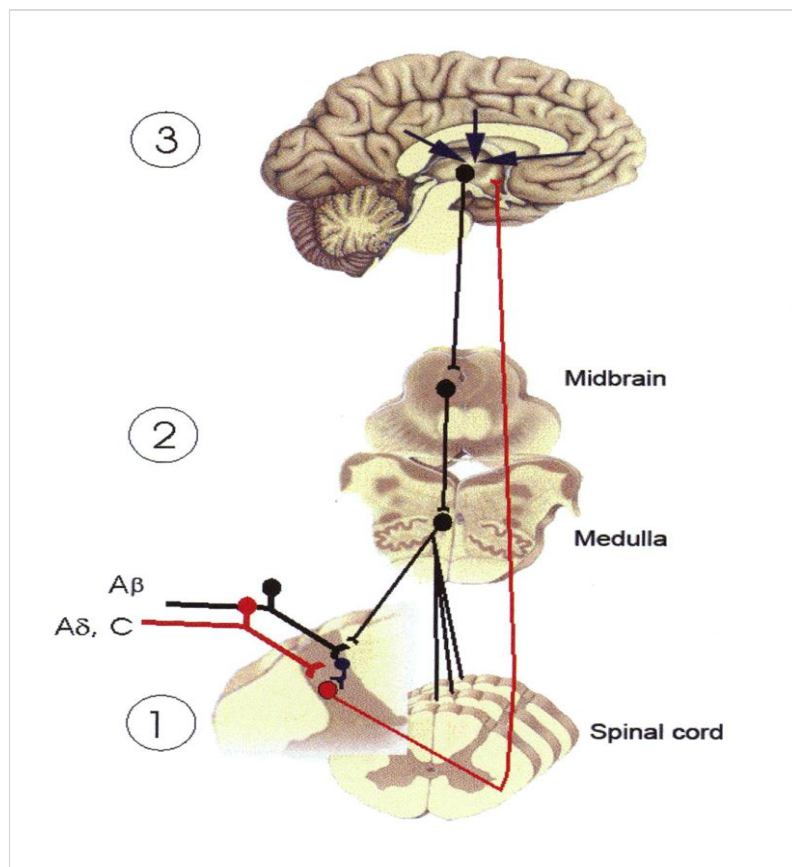
SG substantia gelatinosa, + активиране, - инхибиране

Фигура 3. 1. Gate control и механизми на спинална модулация на ноцицепцията

Механизмите на диенцефална и стволова модулация на ноцицепцията са локализирани главно в PAG и NRM, в които са съсредоточени голям брой серотонинергични и адренергични десцендиращи инхибиторни неврони, както и GABA- и пептид (енкефалини, ендорфини)-съдържащи неврони (Fields, H. L. et al. 1991). PAG интегрира десцендираща невронална активност от структури на лимбичната система и диенцефалон с асцендираща невронална активност от гръбначния мозък и получава

директни синаптични връзки от инсуларния кортекс и медиалната префронтална зона (Bandler, R., Keay, K. A., 1996). Втори основен център, с който PAG образува синаптични контакти е амигдала (Helmstetter, F. J. et al., 1998). От своя страна амигдалното ядро получава масивна инервация от хипоталамуса и неокортекса (Aggleton, J. P., 1992). В PAG проекират неврони от двете ядра на мозъчния ствол n. cuneiformis и substantia reticularis, които са важни катехоламинергични структури в ЦНС. Основна роля в модуляцията на ноцицептивите сигнали играят синаптичните проекции на PAG невроните с NRM. Тези контакти са главно за сметка на серотонин- и невротензин-ергични синапси.

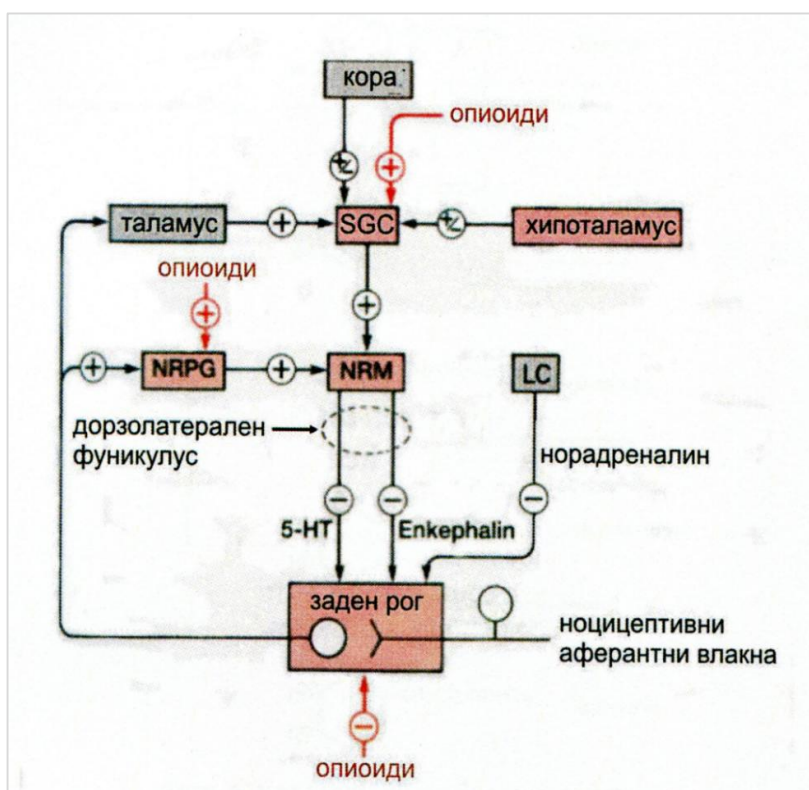
Симплифицирана схема на централните антиноцицептивни пътища е представена на Фиг. 3. 2.



1 спинални инхибиторни механизми, 2 диенцефални и стволони инхибиторни механизми, 3 кортикални механизми
(Цитирана по Marchand, S., 2010).

Фигура 3. 2. Антиноцицептивни пътища и механизми

Въпреки значителния напредък в тази област извънредно сложните структурни и функционални взаимоотношения между елементите на ендогенната антиноцицептивна система не са изяснени до край. Независимо от това наличните клинични и експериментални данни показват, че еферентни влакна от префронталния кортекс и амигдала синапсират директно или индиректно през хипоталамуса в PAG. От своя страна еферентни PAG десцендиращи влакна проектират в NRM. Следващите компоненти на ендогенната антиноцицептивна система са еферентни неврони от NRM, ретикуларната формация и LC, които образуват инхибиторни синапси с ноцицептивните неврони в гръбначния стълб (Фиг. 3.3).



5-НТ серотонин, LC locus coeruleus, NRM nucleus raphe magus, NRPG nucleus reticularis paragigantocellularis, SGC substantia grisea centralis (Модифицирана по Rang, H. P. et al., 2007).

Фигура 3.3. Ендогенна антиноцицептивна система

3.2 Трансмитери, медиатори, рецептори в антиноцицептивната система

Предназначението на ендогенната десцендираща антиноцицептивна система е да потиска болковите възприятия чрез блокиране на ноцицептивната сигнализация на спинално и / или супраспинално ниво. Това може да бъде постигнато чрез трансмитер/ рецептор процеси на взаимодействие, които могат да детерминират (i) директно инхибиране на ноцицепторите, (ii) инхибиране на трансмитерното освобождаване, (iii) активиране на инхибиторните интерневрони, (iv) инхибиране на възбудните интерневрони. Тези невротрансмитер/рецептор взаимодействия започват от специализираните антиноцицептивни ядра в дианцефалон/ствол и синапсират в задните рога на гръбначния мозък. Върху антиноцицептивните неврони в тези ядра синапсират аксоните на клетки, локализирани няколко кортикални и субкортикални центрове, определящи емоционалното моделиране на болката (Fu et al., 2011). Основните компоненти на десцендиращата антиноцицептивна каскада в ЦНС са ендогенната опиоидергична (L- и M-енкефалин, β -ендорфин, динорфин, ноцицептин и специфични μ , δ , κ , ORL1 опиоидни рецептори), норадренергична (норадреналин и специфични $\alpha_{1A, B, D}$, $\alpha_{2A, B, C}$ и $\beta_{1, 2, 3}$ адреноцептори) и серотонинергична (серотонин и 5-HT₁₋₇ серотонинергични рецептори) инхибиторни системи (Vanegas, H., Schaible, H. G., 2004). Недостатъчни са все още данните относно ролята на ендогенните канабиноиди (анандамид и СТ_{1, 2} рецептори) и неврпептиди (холецистокинин, невротензин) в модулацията на болката (Molnoff, P., W., 2011). Инхибиторните опиоидергични неврони в PAG проектират в NRM и ретикуларната формация и медиатират инхибицията на WDR асоциативните неврони в задния рог, което е неврохимична основа на морфин-индуцираната аналгезия. Аксоните от NRM проектират в задния рог на гръбначния мозък и предизвикват освобождаване на NA и 5-HT от асоциативни неврони.

Серотонин-ергични инхибиторни влакна от RVM (rostral ventromedial medulla) синапсират с клетките на първия ноцицептивен неврон. Десцендиращи норадренергични аксони на клетки разположени в LC потискат освобождаването на глутамат от ноцицепторите посредством пресинапсни α_2 адреноцептори. Локализираните в задния рог на гръбначния мозък GABA- и енкефалин-ергични интерневрони потискат чрез активиране на специфични GABA_A, ν - и μ -опиоидергични рецептори асцендиращата алгогенна сигнализация (Lenz et al., 2010). Интензитета на инхибиторното влияние, което оказват върху болковото възприятие фронталния кортекс, gyrus cinguli и хипоталамус зависи в значителна степен от емоционалното и психологичното състояние на индивида (Lenz et al., 1995).

4. ФАРМАКОТЕРАПИЯ НА БОЛКАТА

Лечението на болката е фундаментално човешко право.

4.1 Нестероидни противовъзпалителни средства. Неопиоидни аналгетици

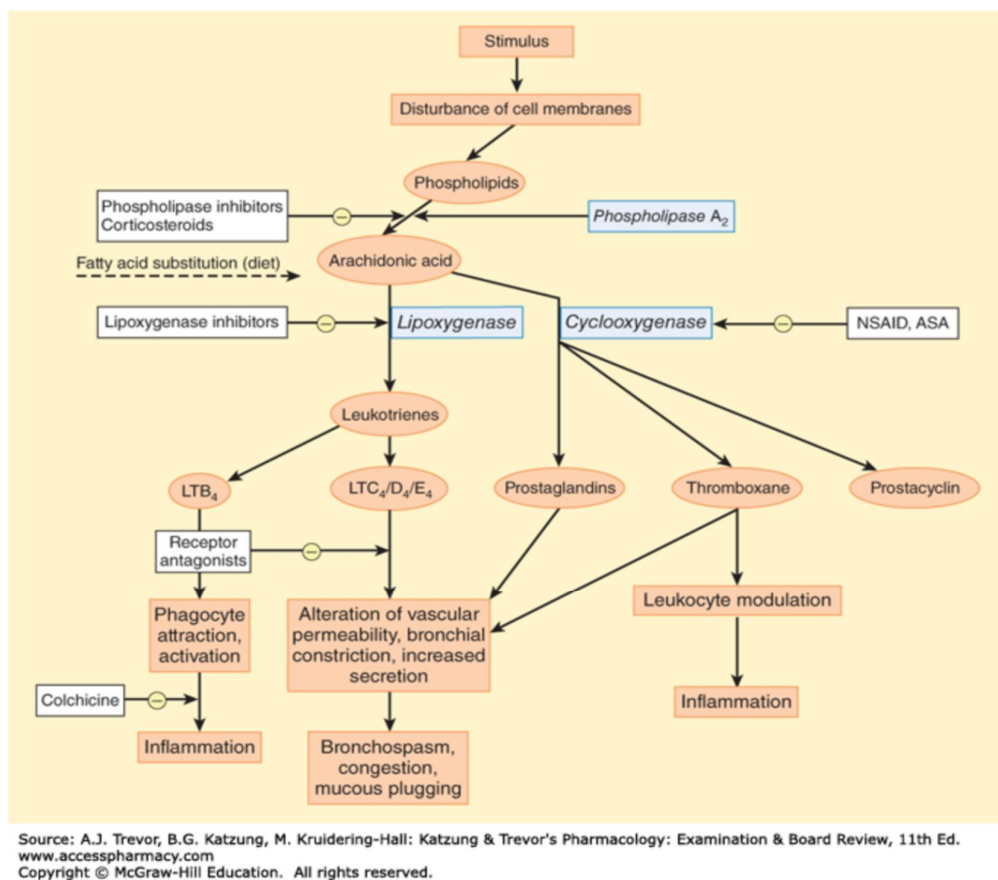
Нестероидните противовъзпалителни средства (НСПВС) са хетерогенна по химичната си структура група от съединения, които имат общи фармакотерапевтични и нежелани странични ефекти. Според химичната структура те са обособени като производни на:

- Диарил хетероциклени (коксиби): (i) *Селективни COX2 инхибитори*: celecoxib, etoricoxib, parecoxib, (ii) *Преференциални COX2 инхибитори*: meloxicam, nimesulide
- Енолна киселина (оксками): lornoxicam, meloxicam, piroxicam, tenoxicam
- Индолоцетна киселина: etodolac, indometacin, ketorolac

- Пропионова киселина: dexketoprofen, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, oхарпроzin
- Салицилова киселина: Aspirin, acetylsalicylic acid
- Фенилоцетна киселина: Aceclofenac, Diclofenac

Въз основа на химичните характеристики по-големия брой НСПВС са слаби органични киселини с относително ниски стойности на рКа, което обуславя редица общи фармакокинетични характеристики, т. е. добра орална резорбция, висока степен на свързване с плазмените протеини, екскретирани чрез гломерулна филтрация или чрез тубулна секреция и способност да акумулират в местата на възпаление (по-ниско рН). Основните терапевтични ефекти, аналгетичен, антипиретичен и анти-инфламаторен, се свързват със способността да инхибират синтеза на простагландини (Vane, J., 1971). Повечето НСПВС са конкурентни, обратими, инхибитори на ензимните системи циклооксигеназа (COX)/PG G/H синтаза. Арахидоновата киселина е субстрат и на ензимите липоксигеназа (LOX), епоксигеназа (EOX), които генерират биологично активните АА-derivати hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) и ерохуеicosatrienoic acids (EETs). Ензимните системи COX/LOX са бифункционални протеини, катализиращи биотрансформация на арахидонова киселина (АА) в ендопероксидни междинни съединения PG G2 и PG H2, от които се образуват простагландини (PG) и тромбоксан А2 (Tx А2) и левкотриени (LT). Всички тези продукти активират G протеин-свързани рецептори (Grosser, T., et al., 2006). При активирането на COX-1 (конститутивна) се генерират PG, които участват като медиатори във редица физиологични реакции, докато при активиране на COX-2 (индуцируема) и LOX се генерират PG, които участват като медиатори в различни патологични процеси. Схема на процесите регулирани от продуктите, генерирани в каскадата на АА и някои

субстанции, които могат да инхибират АА-биотрансформация е представена на Фиг. 4. 1.



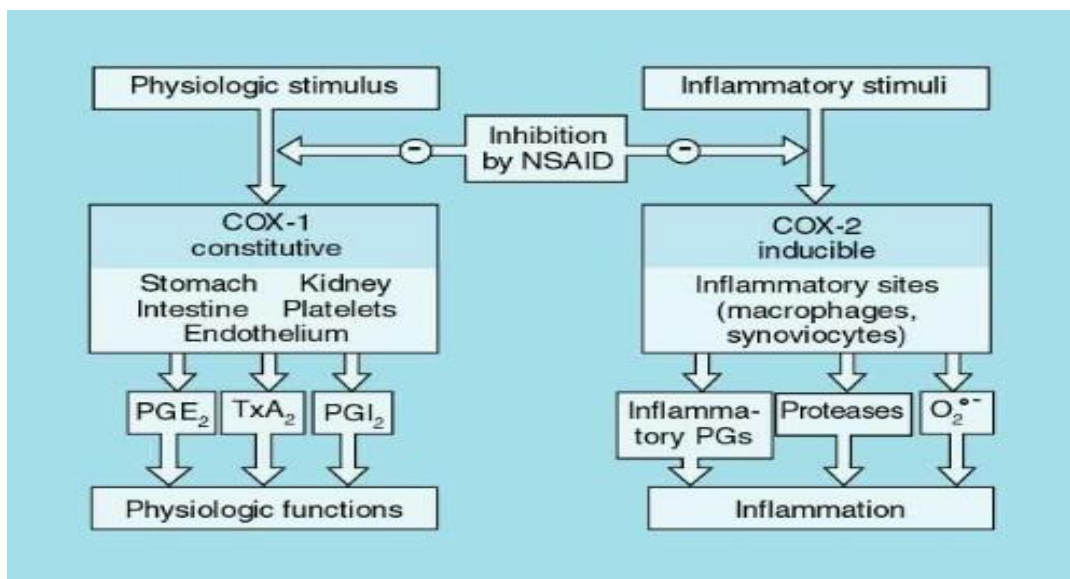
Фигура 4. 1. COX / LOX биотрансформация на АА и принципи ензимни инхибитори (Цитирана по Trevor, A. J., et al., 2015)

Простаноидите са локални медиатори, въввлечени в етиологията и / или патогенезата на важни физиологични и патологични процеси каквито са възпаление, болка, пирексия, сърдечно-съдови заболявания, остеопороза, бронхиална астма, рак, глаукома, мъжка сексуална дисфункция, раждане (Grosser et al., 2006). Простагландин Е2 (PG E2) и простагландин I2 (PG I2) са основните простаноиди, които медиат възпалението чрез активиране на специфични рецептори. Те увеличават притока на кръв локално, съдовата пропускливост и левкоцитната инфилтрация.

Ноцицепторите се активират от различни стимули, като топлина, киселини, или налягане. Възпалителните медиатори, освободени от невронални клетки при тъканно увреждане повишават чувствителността на ноцицепторите (брадикинин, H^+), невротрансмитери (5-НТ, АТР), невротропни растежни фактори (NGF), простааноиди (LTs, PG E2, PG I) намаляват прага на стимулиране на ноцицепторите, причинявайки периферна сензация (Lopshire, J. C., Nicol, G. D. 1998, Pulichino, A. M., et al., 2006). Потискането на периферната сензация се смята, че представлява основа на периферната компонента на аналгетичното действие на НСПВС (Christopher, M., et al., 2008). Те оказват и централно действие в гръбначния и главния мозък: двете основни изоформи на COX (COX-1 и COX-2) се експресират в гръбначния мозък в отговор на стимули на периферна болка (Vanegas, H., Schaible, H. G., 2001). Централно активни са и PG E2 и може би PG D2, PG I2 и PG F2 α , което допринася за централна сензация, манифестирана с увеличена възбудимост на невроните в задните рога на гръбначния мозък, което причинява хипералгезия и алодиния (Reinold, H., et al., 2005). Повлияването на механизмите на периферна и централна сенситизация от НСПВС обуславя високата им ефективност като аналгетици при остра болка (постоперативен период), както и при лечението на хроничната болка.

Регулацията на телесната температура е контролирана от хипоталамуса. Повишената температура при инфекция, увреждане на тъканите, възпаление, отхвърляне на трансплант или злокачествено заболяване е в резултат на повишено образуване на цитокини като IL-1 β , IL-6, TNF- α и интерферони, които действат като ендогенни пирогени. Началната фаза на терморегулиращата реакция спрямо такива пирогени се смята, че е медирана от церамид, освобождаван в невроните на преоптичната област в предния хипоталамус (Sanchez-Alavez, M., et al., 2006). В късната фаза на тази реакция се образува PG E2, който чрез EP3 и може би EP1 рецептори

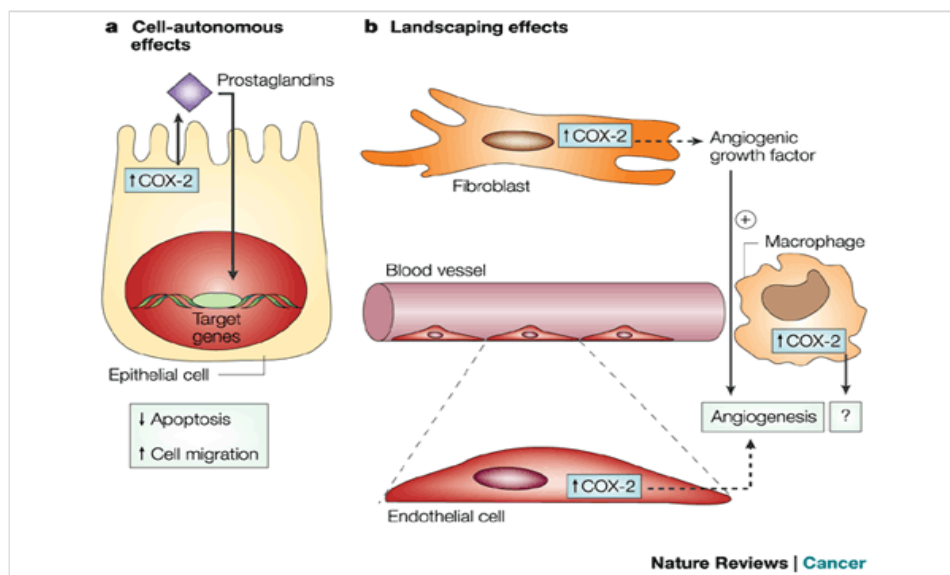
на термочувствителните неврони увеличавана производството на топлинна енергия и намалява топлинните загуби. НСПВС потискат този отговор чрез инхибиция на PG E2 синтезата (Engblom, D., et al., 2003). През 1991 г. Симънс и колегите му откриват изоензим на COX, който наричат циклооксигеназа-2 (Xie, W., et al., 1991). COX-1 изоформата конститутивно се експресира във висока степен в ендотела, моноцити, тромбоцити, бъбречните събирателни каналчета, семенните везикули. В повечето клетки тя е главния източник на „физиологични“ простаноиди, свързани с епителна цитозащита и хемеостаза. С инхибирането на COX-1 се свързват в голяма степен нежелани реакции в стомашно-чревния тракт, които усложняват терапията с неселективни COX-инхибитори (Фиг. 4. 2).



Фигура 4. 2. Възможни нежелани лекарствени реакции при третиране с НСПВС

COX-2 експресията се индуцира от медиатори на възпалението като липополизахариди (LPS), интерлевкин-1 (IL-1), тумор некротичен фактор-алфа (TNF-α) в редица клетки и тъкани, съдов ендотел, остеокласти, моноцити и макрофаги. Заедно с COX-1 този ензим участва в хомеостазата и авторегулацията на възпалението и болката. Освен от инфламаторни цитокини COX- 2 се индуцира от митогени, което показва, че може да

участва в канцерогенезата (Grosser, T., et al., 2006). Натрупват се епидемиологични изследвания, които показват, че употребата на НСПВС е свързано с намален риск от рак, а предклинични и клинични изследвания са показали, че някои от тях са ефективни за лечение и превенция на рак. Този ефект е добре документиран по отношение на карцинома на колона и ректума (Ettaah, R., et al.). Редица ефекти на НСПВС върху раковите клетки, като например стимулиране на апоптоза, потискане на клетъчния растеж, инхибиране на ангиогенезата и инхибиране на метастазите вероятно обуславят тези наблюдения. Потенциални анти-карциномни терапевтични ефекти на НСПВС са илюстрирани на Фиг. 4. 3.



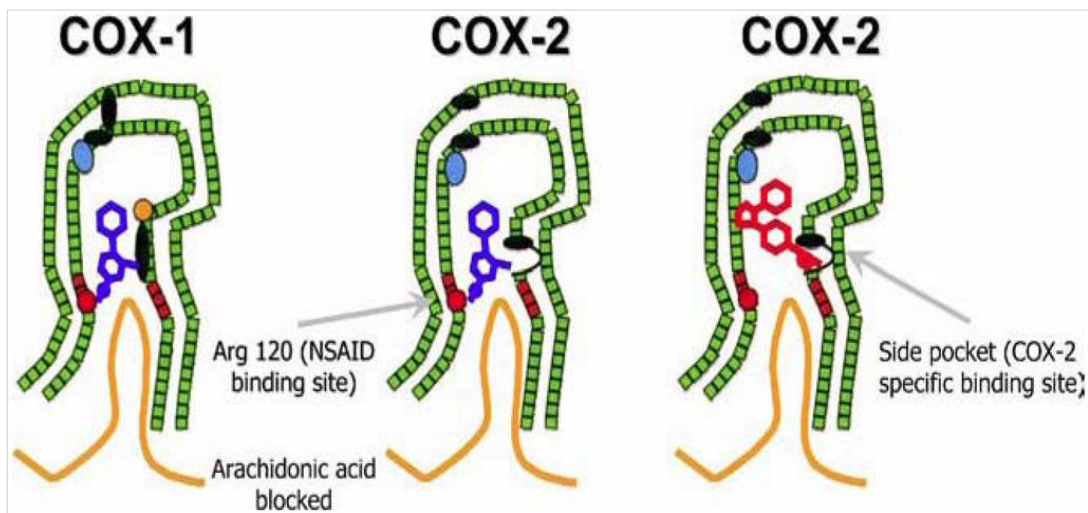
Фигура 4. 3. Потенциални анти-карциномни терапевтични ефекти на НСПВС

Конститутивно проявената COX-1 има специфични функции в репродукцията, бъбречната физиология, костната резорбция и невротрансмисията. Сравнителната характеристика на COX-1 и COX-2 е резюмирана в Табл. 4. 1.

**Таблица 4.1. Сравнителна характеристика на COX-1 и COX-2
(Модифицирана по: Praveen, R. P. N., Knaus, E., 2008)**

Характеристика	COX-1	COX-2
mRNA	2.8 kb	4.1 kb
mRNA регулация	Конститутивна	Индуцируема
Индукция	-	LPS, цитокини
Локализация	Ендоплазмен ретикулум	Ядрена мембрана, ендоплазмен ретикулум
Молекулно тегло	70 kD	70-72 kD

Ако само на основата на диференциална генна експресия между COX изоформи бъде заменен генът на COX-2, с тази за COX-1 не би трябвало да е налице видима промяна във фенотипа. Въпреки това, "Knockin" на COX-1 гена в мястото на COX-2 в мишки само частично запълва дефицита в синтеза на PG I₂ и не успява напълно да облекчи дефекти в репродуктивната и бъбречната функции, свързани с COX-2 заличаването. Тези резултати ясно показват, че COX-1 и COX-2 не са функционално взаимнозаменяеми на ниво протеинен синтез (Rouzer, C. A., Marnett, L. J., 2009). COX ензимите са забележително подобни, с подобен хидрофобен тунел, който дава достъп на липидния субстрат до активното място дълбоко в протеиновата молекула. Въпреки това „тунела“ на COX-2 има страничен джоб, който липсва в структурата на COX-1 (Фиг. 4. 4).

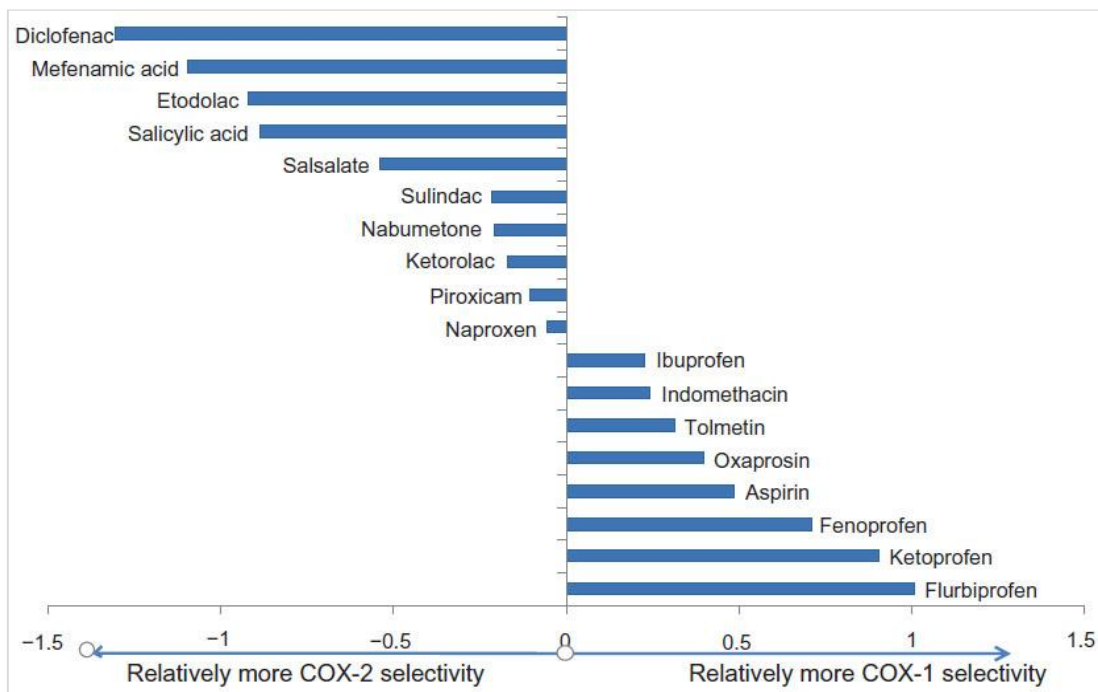


Фигура 4. 4. Вторична структура на COX-1 и COX-2
(Цитирана по Rouzer, C. A., Marnett, L. J., 2009)

Изясняването на структурите на COX бе предпоставка за откриването на селективните COX-2 инхибитори (коксиби). Днес класификацията на НСПВС най-често се базира на тяхната COX-1 / COX-2 инхибиторна активност, което до голяма степен предсказва толерантността към тях (Praveen, R. P. N., Knaus, E., 2008):

- НСПВС инхибиращи напълно с малка селективност както COX-1, така и COX-2 (*аспирин, ибупрофен, индометацин, напроксен, пироксикам*)
- НСПВС инхибиращи с 5 - 50 пъти по-голяма селективност COX-2 (*етодолак, мелоксикам, нимезулид, целекоксиб*)
- НСПВС инхибиращи с над 50 пъти по-голяма селективност COX-2 (*рофекоксиб, NS-398*)
- НСПВС инхибиращи слабо както COX-1, така и COX-2 (*5-аминосалицилова киселина*)
- натриев салицилат, набуметон, сулфасалазин

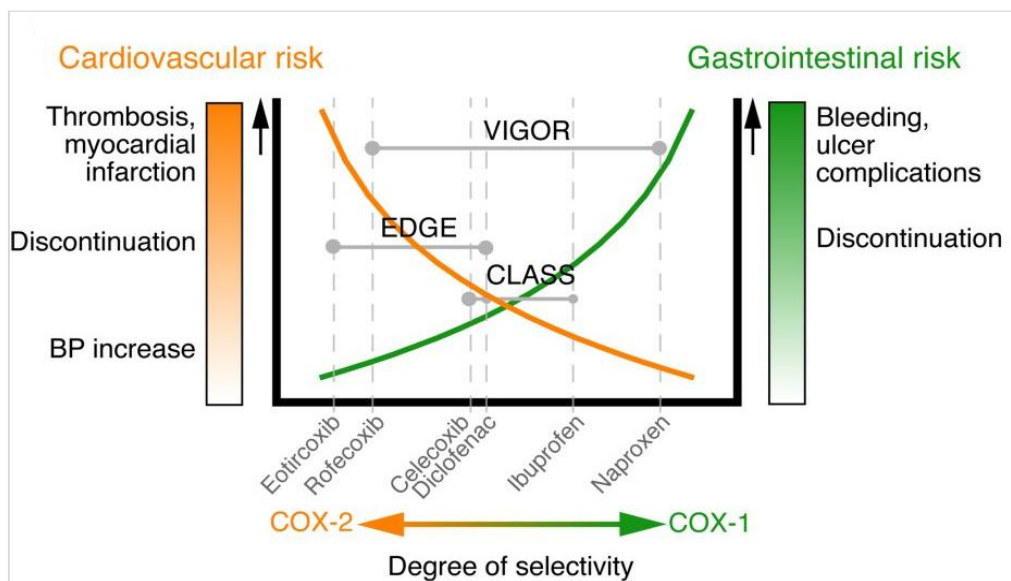
Относителната селективност (COX-1/COX-2) на различни COX инхибитори е представена на Фиг. 4. 5.



**Фигура 4. 5. Относителна селективност на COX инхибитори
(Цитирана по Praveen, R. P. N., Кнаус, Е., 2008)**

Откриването на коксибите бе посрещнато с надеждата, че ще се преодолее риска от стомашно-чревните смущения, наблюдавани при „класическите“ неселективни COX инхибитори. COX-1 е изоформата, която се експресира в тромбоцитите и е отговорна за формирането на ТхА2, който е силен индуктор на адхезията и агрегацията на тромбоцитите. Ацетилсалициловата киселина (единствена от всички НСПВС) действа като необратим инхибитор на COX-1 в тромбоцитите чрез ацетилиране на Ser530 остатък. Това води до блокиране на синтеза на ТхА2, с което се намалява риска от тромбоза. Ендотелните клетки произвеждат PG I2, който има антитромботично и вазодилатиращо действие. COX-2 е основната изоформа в ендотелните клетки и е основния ензим катализиращ генерирането на PG I2 в каскадата на АА (Borer, J. S., Simon, L. S., 2005, CNT collaboration, 2013). Кардиотоксичните ефекти на селективните COX-2 инхибитори бяха прецизно документирани (Borer, J. S., Simon, L. S., 2005, Grosser, T., et al., 2011) при използване на лекарствения продукт rofecoxib (Vioxx). Зависимостта COX селективност/потенциален риск от нежелани

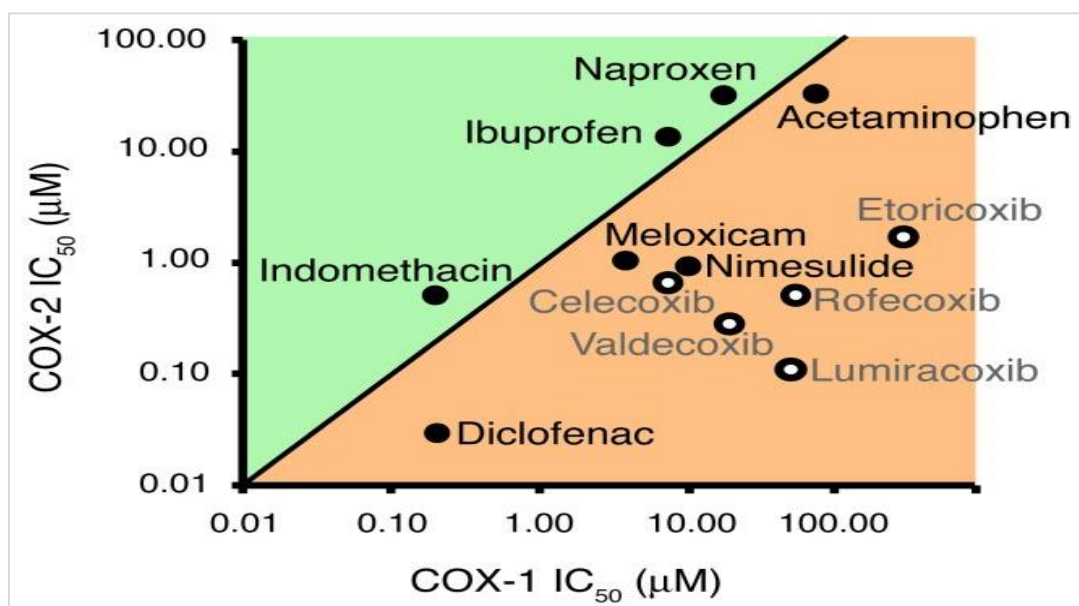
лекарствени реакции за някои масово използвани в клиничната практика лекарствени продукти е представена на Фиг. 4. 6.



Фигура 4. 6. Зависимост селективност / риск за някои COX инхибитори (Цитирана по: Grosser, T., et al., 2011)

Прилагането на коксиби при пациенти с повишен риск от сърдечно-съдово заболяване (напреднала възраст, хипертония, диабет и други) се свързва с висок риск от сърдечно-съдови нежелани събития по време на лечението с НСПВС. При оценяване на риска трябва да бъдат взети предвид фактори като доза, степен на COX-2 селективност, време на полуживот, ефикасност и продължителност на лечението. Селективните COX-2 инхибитори трябва да бъдат прилагани на пациенти с висок риск от стомашно-чревни усложнения, но кратковременно – 5-10 дни, за да се избегне риска от проява на нежелани сърдечно-съдови събития (Grosser, T., et al., 2011, CNT collaboration, 2013). Друг добре познат риск при използване на НСПВС е тяхната нефротоксичност. Проучванията показват, че индуцираната от НСПВС задръжка на натрий при здрави и по-възрастни пациенти се свързва с инхибиране на COX-2, докато намаляването на гломерулната филтрация се дължи на инхибиране на COX-1. Тези

проучвания потвърждават становището, че двете COX изоформи участват в бъбречната физиология, което ограничава употребата на НСПВС при пациенти с увредена бъбречна функция (Grosser, T., et al., 2011). Освен нефротоксичност и гастро-дуоденална улцерогенност, неселективните COX-1/COX-2 инхибитори могат да проявят и бронхоспастичност (например добре известна е т.нар. „аспиринова астма“, свързана със засилен синтез на левкотриени). Сравнителна скала на COX-1/COX-2 ефективността на различни НСПВС е представена на Фиг. 4. 7.



Фигура 4. 7. Сравнителна скала на COX-1 / COX-2 ефективност на НСПВС (Цитирана по: Grosser, T., et al., 2011)

През 2002 г. бе открита трета изоформа COX-3, присъстваща като сплайс-вариант на COX-1 при кучета. Демонстрирано е, че парацетамол, който в терапевтични концентрации слабо инхибира COX-1, блокира COX-3 (Praveen, R. P. N., Knaus, E., 2008, Chandrasekharan, N. V., et al., 2002). Известна селективност към COX-3 проявяват metamizol (analgin) и ibuprofen, известни като аналгетици-антипиретици. Лекарствата от тази група са аналгетични средства на избор поради предизвикването на слабо

изразени стомашно-чревни смущения и малък риск от нежелани сърдечно-съдови реакции при съответните индикации:

- Аминофеноли (анилиди): paracetamol
- Пиразолони: metamizole (Dipyrone)
- Активатори на K⁺ канали: flupirtin
- Блокатори на Ca²⁺ N-канални: ziconotide

Тези лекарствени продукти не предизвикват характерните за COX-1 нежелани лекарствени реакции. Само в двукратно по-високи дози Ibuprofen може да блокира и COX2 и да прояви противовъзпалително действие. Клиничната значимост на COX-3 е дискутабилна (Davies, N. M., et al., 2004). Механизмите на действие на парацетамол и метамизол не са напълно изяснени. И двете субстанции образуват метаболити, които проявяват фармакологична активност. Показано е, че парацетамол може да активира канабиноидните CB1 рецептори, което допринася за аналгетичния му ефект. В експериментални изследвания е установено, че метамизол стимулира освобождаването на бета-ендорфин (Власковска, М., и сътр., 1989, Bertolini, A., et al., 2006).

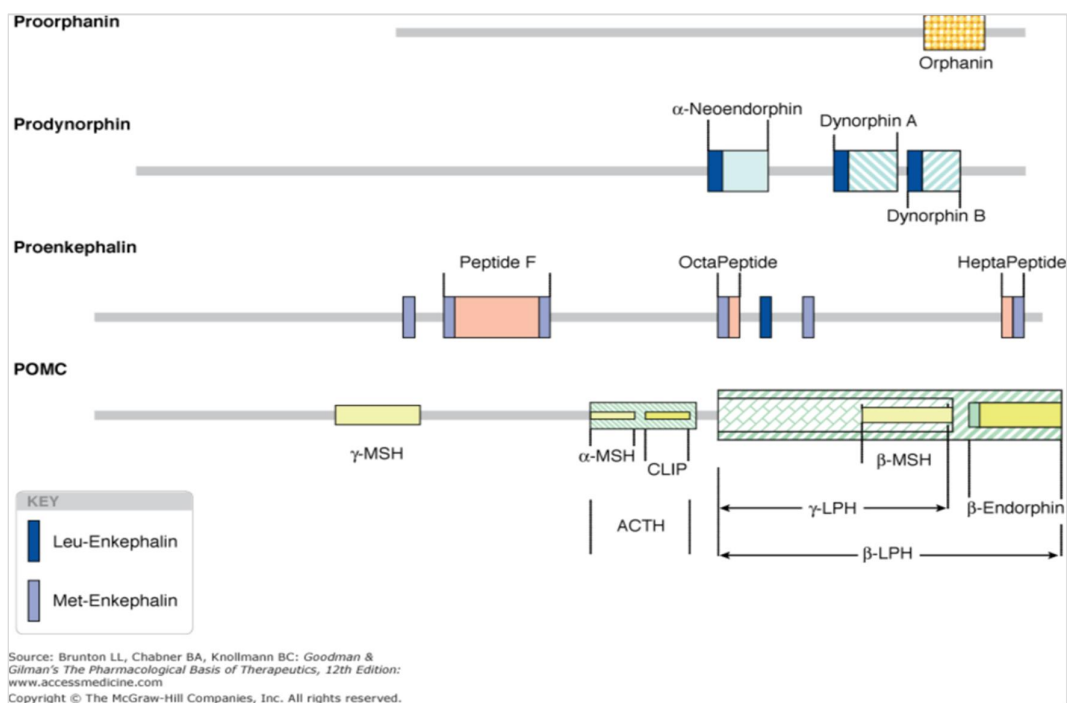
4.2 Опиоидни (наркотични) аналгетици

Термина *опиоидни аналгетици* се прилага за всички субстанции от ендегенен и синтетичен произход, които предизвикват морфиноподобни ефекти, специфично блокирани от антагонисти като налоксон (Trescot, A., et al., 2008). През 1806 год. немския фармацевт Serteurner изолира чиста субстанция от опиум, която нарича морфин на името на гръцкия бог на сънищата *Morpheus*. С откриването на морфина Serteurner поставя начало на изследванията на нов клас химични съединения наречени алкалоиди.

Многообразните ефекти на опиоидните агонисти поставят пред науката въпроса за наличието на специфични рецептори за тях и съществуването на ендогенни лиганди. В 1973 год. независимо един от друг Pert и Snyder, Erick Simon, Lars Terenius откриват морфин-свързващи места (μ -опиоидни рецептори) в изолирани мозъчни мембрани. През 1975 год. Hughes, Smith, Kosterlitz изолират от мозък ендогенни пентапептиди, които се свързват със специфични рецептори (δ опиоидни рецептори) ги наричат енкефалини от “*en cephalos*” (в главата). Същата година Terenius и Walstrom изолират ендогенния олигопептид β -endorphin, който се свързва с μ - и δ -опиоидни рецептори. В 1979 год. в лабораторията на Goldstein е изолиран ендогенен олигопептид наречен dynorphin, който се свързва с κ -опиоидни рецептори. След тези открития изминават нови 20 години когато през 1989 год. Brigitte Kiffer осъществява първото клониране на опиоидни рецептори (Виж: Trescot, A., 2015, Yaksh, T. L., Wallace, M. S., 2011, Dickenson, A. H. Kiffer, B., 2006, Waldhoer, M., et al., 2004). В 1976 год. на базата на емпирични данни от многобройни изследвания W. Martin лансира хипотезата, че има три отделни типа опиоидни рецептори наречени капа, μ и делта, които селективно свързват специфични екзогенни и ендогенни лиганди (Martin, W. R., 1983).

През 2000 год. Комитета по номенклатура на рецепторите и класификация на лекарствата (CRNDC) към Международния съюз за фармакологични науки (IUPS) въведе нова номенклатура, в която различните опиоидни рецептори се означават като KOR, MOR и DOR, които да заместят термините респ. капа (κ), μ и делта (δ) опиоидни рецептори. Идентифицирани са няколко отделни семейства ендогенни опиоидни пептиди: енкефалини, ендорфини и динорфини. Ендогенните лиганди за опиоидните рецептори произлизат / се образуват от големи прекурсорни протеини, които са prepro-opiomelanocortin (POMC), prepro-

enkephalin и prepro-dynorphin, кодирани от съответни гени. Прекурсорните молекули са плурипотентни и под въздействие на специфични пептид-процесиращи ензими се получават биологично / рецепторно активни пептиди с различна дължина и профил на действие. Така напр. POMC е източник за получаване на АСТН, α - и β -меланоцит-стимулиращ хормон, β -липотропин и β -ендорфин. От препро-енкефалина се получават дълги пептиди (BAM, Peptide E), които финално се процесират до Met-enkephalin и Leu-enkephalin. От препро-динорфина се получават дълги пептиди като Leumorphin, Dynorphin 32, както и по-късите Dynorphin A1-17, Dynorphin B, α -neoendorphin (Виж: Yaksh, T. L., Wallace, M. S., 2011, Dickenson, A. H. Kiffer, B., 2006, Власковска, М., 2002). Симплифицирана схема на тези трансформации е представена на Фиг. 4. 7).



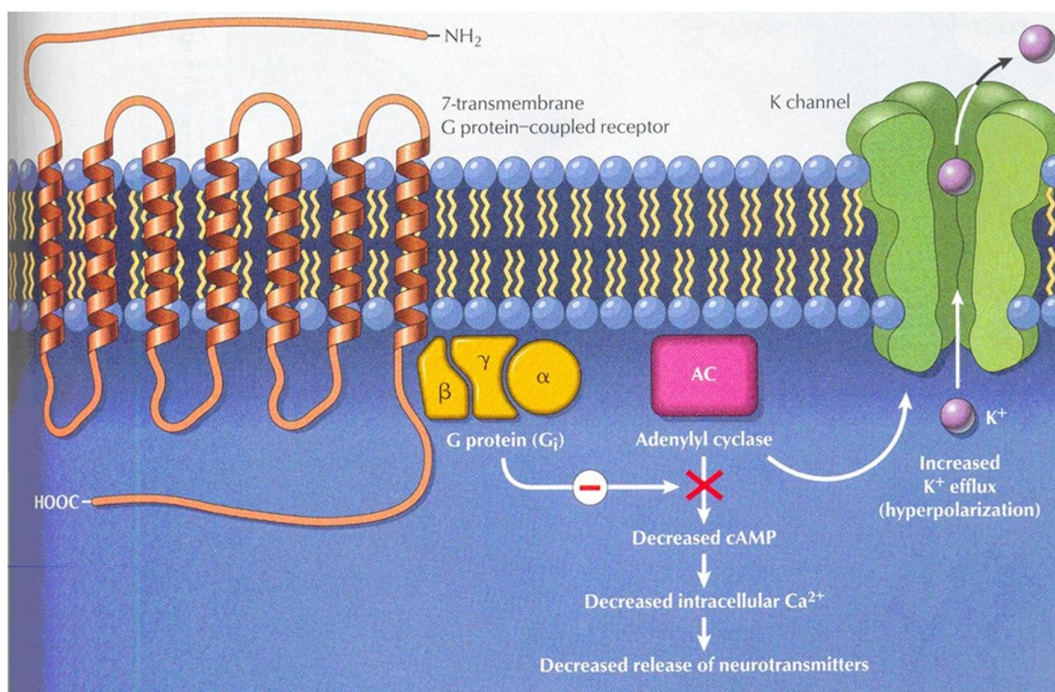
Фигура 4. 7. Прекурсорни молекули и трансформации за генериране на ендогенни опиоиди лиганди (Цитирана по: Yaksh, T. L., Wallace, M. S., 2011)

В 1995 год. е открит четвърти член на ендогенната опиоидна система Pro-orphanin с активен пептид наречен Nociceptine, който взаимодейства с ORL1- рецептор. Прекурсорна молекула на ноцицептин (N / OFQ, 130 -146), ноцистатин (110 - 127) и орфанин 2 (149 - 165) е препро-орфанин (Виж: Vlaskovska, M., Kasakov, L., 2000).

Клонирането доказва съществуването на четири основни типа рецептори: μ (MOP), δ (DOP), κ (KOP) и ORL1- (NOP) опиоидни рецептори със съответни ендогенни лиганди β -endorphin, Met-enkephalin, dynorphin A и nociceptin (N / OFQ). μ (MOP) рецепторите са локализирани предимно в мозъчния ствол, вентрикулите и среден таламус и активирането на тези рецептори има водещо значение за супраспиналната аналгезия, респираторна депресия, еуфория, седация, намаления стомашно-чревен мотилитет, имуносупресията и физическа зависимост. κ (KOP) рецептори се намират в лимбичната система, мозъчния ствол и гръбначния мозък и тяхната активация е отговорна за спиналната и периферната и особено висцерална аналгезия, седация и дисфория. С дисфоричния ефект се обяснява частично отсъствието на зависимост към κ -агонистите. Агонисти за κ -рецепторите, напр. buprenorphine, взаимодействуват с ORL1 (NOP) рецепторите. Прието е, че δ (DOP) рецепторите са отговорни за психозомиметични и дисфорични ефекти. С прилагането на селективни агонисти и по разлики в поведенческите реакции са описани подвидове на μ - рецепторите, съответно μ_1 , μ_2 и μ_3 и на δ - рецепторите, съответно δ_1 и δ_2 , което обаче не бе потвърдено с молекулярно-биологични технологии. Открити са 9 splice-варианта само на μ -опиоидните рецептори, което

обяснява наблюдаваните различия в профила и силата на ефектите на μ -агонистите (Dietis, N., et al., 2011, Власковска, М., 2002).

Опиоидните рецептори са G-протеин куплирани и тяхната активация се свързва с интрацелуларни процеси, водещи до инхибиране на аденилилциклезата, потискане на волтаж-зависимите Ca^{2+} -канални, пресинапсно инхибиране на освобождаването на невротрансмитерите ацетилхолин, норадреналин, серотонин, субстанция Р. Постсинапсно локализираните рецептори предизвикват хиперполяризация вследствие активиране на K^{+} канали. По този начин цялостният ефект на опиоидите върху клетъчната активност при остър ефект е инхибиране (Chah, L. A., 1996). Схема на тези процеси е представена на Фиг. 4. 8.



Фигура 4. 8. Молекулни механизми на действие на опиоидните пептиди

Инхибирането на един инхибиторен неврон може да доведе до възбуждане на следващите неврони. Допаминергичната система в областта

на вентралния тегментум (VTA) е ендогенната система свързана с удоволствието. Инхибирането на GABA невроните в тази област увеличава освобождаването на допамин, което засилва удоволствието и еуфорията, и стои в основата на злоупотребата с опиоиди (също и на алкохол, никотин и бензодиазепини) (Nestler, E. J., 2001).

Опиоидите могат да бъдат класифицирани по различни белези:

- Според произхода: Алкалоидите на опиума са две основни групи химични съединения: пиперидинфентраненови (10 % морфин, 0,5 % кодеин и 0,2 % тебаин) и бензилизохинолинови (1 % папаверин и нарцеин, 6% наркотин) и бензилизохинолинови производни, които са спазмолитици и нямат аналгетично действие. Полусинтетични производни са heroin (diacetylmorphine), dihydrocodeine, buprenorphine. Синтетични производни са pethidine, fentanyl, sufentanil, methadone, tramadol и други.
- Според рецепторните взаимодействия: Чисти агонисти, които имат висок афинитет към трите типа рецептори, без таван на аналгетичното действие. В тази група са повечето от опиоидните аналгетици. Парциални агонисти и смесени агонист / антагонисти: Buprenorphine е парциален агонист за μ -рецепторите и пълен агонист за κ - и ORL1-рецепторите. Nalbuphine и butorphanol са конкуритивни μ -рецепторни антагонисти, но упражняват аналгетичен ефект чрез взаимодействие с κ -опиоидните рецептори. Тези лекарствени продукти имат таван на аналгетичното действие и предизвикват дисфори, което ограничава тяхната употреба. Naloxone и naltrexone са широко използвани антагонисти на опиоидните рецептори. Те предизвикват абстиненция при зависими пациенти и се прилагат като специфични антидоти при предозиране на опиоиди, както и за третиране при неопиоидни зависимости (Yaksh, T. L., Wallace, M. S., 2011).

Опиоидните аналгетици са основни лекарства за фармакотерапия на остра ноцицептивна болка, като пост-оперативна или пост-травматична

болка, висцерална болка при кардио-исхемична болест, както и за аналгезия при карциномна болка или много силна болка при хронични болкови синдроми (Trescot, A., 2015). Опиоидите са много ефективни при инфаркт на миокарда, тъй като потискат тежката висцерална болка и като потискат барорецепторите, понижават симпатиковата импулсация и така стабилизират дейността на сърдечно-съдовата система. Един сериозен проблем е бързото развитие на толерантност към сърдечно-съдовите ефекти на опиоидите.

Добре известно е, че опиоидите често причиняват различни странични ефекти като респираторна депресия, седация, обстипация, гадене и повръщане (Benyamin, R., et al., 2008). Тези нежелани странични реакции могат да бъдат значителни и някои пациенти са принудени да отказват фармакотерапията с опиоидни аналгетици дори когато изпитват силна болка, което е причина за недостатъчно и / или неадекватното облекчаване на болката (McNicol, E., et al., 2003). Обстипацията е най-честата нежелана последица от лечението с опиоиди, която е наблюдавана при 40-95 % от пациентите в резултат на активирането на μ -рецепторите СЧТ (Swegle, J. M., Logemann, C., 2006). Това е сериозен проблем при продължително прилагане на опиоиди, най-често при ракова болка, тъй като при третирането по-бързо се развива толерантност към аналгетичния ефект и по-бавно се развива толерантност към гастроинтестиналните ефекти на опиоидите. В резултат се затваря един порочен кръг, в който повишаването на дозата на опиоида за постигане на аналгетичния ефект засилва обстипацията. Гадене се наблюдава при 25 % от пациентите, лекувани с опиоиди (Flake, Z. A., et al., 2004). Механизъмът на възникване на гадене включва директна стимулация от опиоида на тригерната зона, потискане на перисталтика в СЧТ и повишаване на възбудимостта на вестибуларния апарат. Гаденето представлява много сериозен проблем при съчетаването на химиотерапевтични средства с опиодни аналгетици при лечение на

злокачествени заболявания. При голям брой пациенти, приемащи продължително време опиоиди, се появява централна апнея по време на сън, която е симптоматична за изразена респираторна депресия (Teichtahl, H., et al., 2001). Седация се наблюдава при 20 % до 60 % от пациентите третирани с опиоиди и се свързва с начало на терапията или с увеличение на дозата (Cherny, N. I., et al., 2001). Когнитивните нарушения могат да се засилят при инфекция, дехидратация, метаболитни аномалии, или напреднал стадий на заболяването (Cherny, N. I., 2000). Острото и хронично опиоидно приложение може да предизвика инхибиторни ефекти върху клетъчните имунни отговори, експресията на цитокини и фагоцитната активност (Roy, S., Loh, H. H., 1996). Установено е, че продължителната употреба на опиоиди води до значително потискане на имунния отговор и засилена податливост към инфекциозни заболявания (Yaksh, T. L., Wallace, M. S., 2011). При 2 % до 10 % от пациентите третирането с опиоиди предизвиква сърбеж, което е резултат от директното освобождаване на хистамин от мастоцитите (McNicol, E., et al., 2003). Освобождаването на хистамин може да има отношение към периферната вазодилатация и хипотензивния ефект на опиоидите. Хистаминолиберацията може да се превърне в сериозно усложнение при пациенти с прояви на бронхоконстрикция / астма.

5. ОПИОИДНИ ТОЛЕРАНТНОСТ, ЗАВИСИМОСТ, АБСТИНЕНЦИЯ

Толерантността е поява на необходимост за повишаване на дозировката, за да бъде постигнат началния аналгетичен ефект. Толерантност настъпва при фармакотерапия с почти всички опиоидни аналгетици и води до понижаване на ефективността на аналгетичната терапия с опиоиди. При прилагане на морфин толерантност може да се развие след 12 - 24 часа, като е по-изявена спрямо аналгетичния ефект, респираторната депресия, повръщането, еуфорията, и се появява значително по-бавно спрямо морфин-

предизвиканите обстипация и миоза. Развитието на толерантност е резултат на адаптационни промени както към хроничния ноцицептивен стимул, така и към продължителното въздействие на опиоида върху опиоидните рецептори в ноцицептивния невроаксис и центъра за възнаграждане. В целуларните механизми за толерантност важна роля играят G-протеини, сАМР, МАР кинази, транскрипционни фактори, глутаматергични и нитроксидергични невротрансмитерни процеси. Като цяло би могло да се обобщи, че при злоупотреба с опиоиди след остро приложение настъпват адаптивни промени в опиоидните рецептори (десенсбилизация и / или интернализация), а при хронично приложение се развиват адаптивна толерантност и down-regulation (Feng, Y., et al., 2012). Ако третирането с опиоид е внезапно преустановено, могат да възникнат ефекти обратни на ефектите „типични“ за прилаганата субстанция, които са обединени в т. н. „синдром на отнемане“ (withdrawal syndrome), и са патогномонични за физическата зависимост от този опиоид (O' Brien, C. P., 2011). Когато опиоидите и другите адиктивни психотропни средства се използват НЕ по лекарско предписание като лекарствени продукти, а с цел подобряване на субективното усещане за благополучие се говори за злоупотреба / зависимост към опиоиди. Адиктивните средства се превръщат в световен проблем заради способността им да предизвикват удоволствие (еуфория, чувство на възнаграждане). Понастоящем се приема, че злоупотребата с психоактивни средства / наркотици е хронична, рецидивираща мозъчна болест (McLellan, A. T., et al., 2000). При животните “удоволствието” се манифестира с волево само-инжектиране с неконтролируемо увеличени (*reinforcing*) количества (дозы) на опиоида (Self, D. W., Nestler, E. J., 1995), което може да бъде „квази-еквивалент“ на чувството за възнаграждане (еуфория) при хората. Чувството за възнаграждане се асоциира непосредствено с ефектите на привикване (адаптиране) към хронично прилагания опиоид. В тези ситуации преустановяване на третирането би

предизвикало аверзивни реакции (dysphoria), болка и различни вегетативни реакции като гадене, повръщане, изпотяване, диария, намаляване на телесното тегло и т. н.

Зависимостта към опиоиди най-често преминава няколко последователно етапи:

- Развитие на психична зависимост, която се проявява като импулсивно, неконтролируемо желание за получаване на удоволствие или комфорт от наркотичното вещество. Индивида възприема наркотика като единственото средство за постигане на социалните си адаптация и благополучие.
- Развитие на толерантност, която се манифестира с императивна необходимост от непрекъснато нарастване на дозировката, за да бъде постигната първоначалната степен на удоволствието (ефекта от всяка следваща доза става по-слаб).
- Поява на феномени на сензитизация, които се манифестират като потенциране на отговора, предизвикан от приемането на следваща доза опиоид. Трябва да бъде подчертано, че едновременно в различни мозъчни ядра може се развиват феномени както на толерантност, така и на сензитизация (Koob, G. F., 1996).
- Развитие на физическа зависимост, проявена с абстинентен синдром (реакция на отнемане, т. н. withdrawal), който за различните опиоиди има различна интензивност.
- Злоупотреба, която е употреба на психоактивни субстанции в дозировки, от които настъпва срив на психичното и/или физическо здраве на индивида.

Зависимост към опиоидните субстанции може да възникне, когато наркотичните субстанции се прилагат в достатъчно високи дози, при достатъчно голяма честота на приемите и за достатъчно дълъг период от време. Наркомания не може да се развие ако индивида не е имал реален

контакт с наркотик. Мощен тласък в изучаване на механизмите на опиоидни толерантност / зависимост е постигнат с развитието на молекулярно-биологичните технологии и въвеждането на позитрон-емисионната томография (ПЕТ) в медицината. Прилагайки ПЕТ технология е показано, че при пациенти с клинично верифицирана зависимост към хероин или кокаин, състоянието на еуфория индуцирана от приемане на наркотик се характеризира с рязко активиране на допаминергичните мезокортиколимбични ядра *amigdala*, *nucleus cingulate anterior (nCa)*, *nucleus accumbens (nAc)*, *ventral tegmental area (vTA)* и темпоралните зони на церебралния кортекс. В тези зони на ЦНС са установени високи нива на ендогенните опиоидни пептиди ендорфин и енкефалини, които при такива стимули нарастват драстично (DiChiara, G., North, R. A., 1992). Аналогично активиране се наблюдава и при други стимули, имащи значение за оцеляване на индивида и вида в т. ч. храна, секс, успешно свършена работа, хазарт и други възприемани от индивида като удоволствие и / или възнаграждение. Големите масиви от различни, понякога дори противоречиви данни, получени в голям брой експериментални и клинични изследвания засега трудно могат да бъдат обяснени с един интегрален теоретичен модел.

Съществуват три теории, които имат за цел да обяснят как приема на опиоидни лекарства се трансформира в импулсивна жажда и пристрастеност към опиоиди при потенциалната заплаха зависимостта да се развие отново след продължителен „*чист*“ (no drug) период.

I. Опиоидната зависимост е резултат от невъзможност да бъде възстановена хомеостазата при продължителна екстремна стимулация на нервната система с опиоидни субстанции (Koob, G. F., Le Moal, M., 1997).

II. Опиоидната зависимост е последица от поведенска сензитизация, от която присъщите за дадена опиоидна субстанция първоначално „*но-интересни*“ за индивида поведенски ефекти се трансформират в

импулсивна зависимост на индивида към този опиоид (Robinson, T. E., Berridge, K. C., 2003).

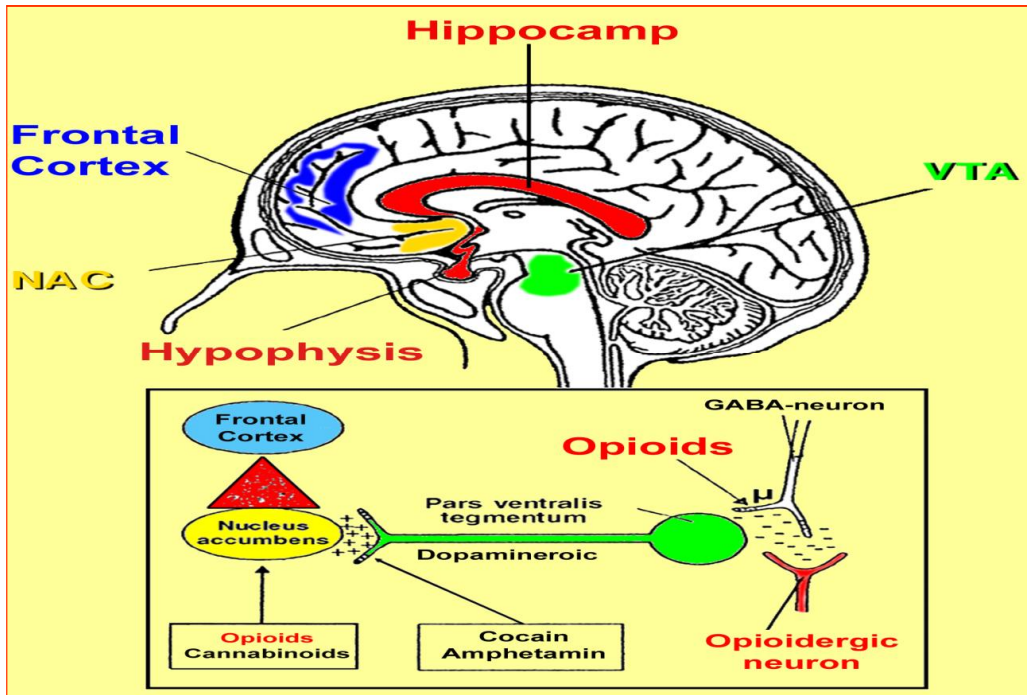
III. Опиоидната зависимост се дължи на аберантни промени в механизмите на памет и обучение индуцирани от продължителна употреба на опиоиди, което обуславя силни и анормални поведенски реакции спрямо субстанции с опиоидно действие (Berke, J. D., 2003).

Експериментални данни показват, че след хронично третиране с опиоиди предизвикващо развитие на опиоидна зависимост, намаляват значително (25%) размерите на невроните, притежаващи допаминергични D₂ рецептори и нивата на ендогенните опиоидни пептиди, което се асоциира с депресивни и демотивационни ефекти (Terenius, L., 1984). В стадия, когато са настъпили съществени адаптивни целуларни промени, зависимите индивиди използват наркотика, за да се чувстват нормално, а не еуфорично. Установено е също, че продължителната и тежка зависимост води до деструктивни изменения в мозъчните клетки, близки до увредите, предизвикани от травми на мозъка. Тези морфологични промени могат да бъдат свързани с липсата на пълноценно възстановяване при закъсняла терапия на зависимите пациенти. Основните адаптивни промени са най-масивни в три зони на ЦНС, върху които конвергират ефектите на опиоидните субстанции:

- Мезокортиколимбична система, която контролира удоволствието и мотивацията
- Чрез допамин и опиоиди като принципни невротрансмитери. кортико-хипокампадна система за асоциативна памет и glutamate, NMDA и опиоидни пептиди като принципни невротрансмитери.
- Тази система има много голямо значение за условно-рефлекторните механизми на зависимостта и връщане към употреба на наркотици, т. е. “рецидив” на опиоидната зависимост.
- Физическа зависимост (реакция на отнемане), която се контролира главно от locus coeruleus (LC), регулиращ будното състояние,

вниманието, тонуса на АНС и способността за реакция при стрес (Koob, G. F., 1996).

Симплифицирана схема на анатомични структури и трансмитерни системи в ЦНС, които са въввлечени в процесите на опиоидни толерантност / зависимост / абстиненция е представена на Фиг. 4. 8.



Невроните в LC експресират μ -опиоидни и α_2 -норадренергични рецептори (Aghajanian, G. K., et al., 1994), които са куплирани към K^+ -каналы с общ G_0 -инхибиторен протеин.

Фигура 4. 8. Структури / ядра в ЦНС, които участват в развитието на ефекта на „възнаграждение“, които е индуциран от употреба на наркотици (Цитирана по Koob, G. F.,1996)

Убедителни данни показват, че в реакциите на отнемане са въввлечени и други структури (PAG, pPGC, pPVH) в междинния мозък (Christie, M. J., et al., 1997), където са съсредоточени адренергични, серотонинергични, опиоидергични и нитроксидаергични невротрансмитери механизми (Hunt, S. P., Urch, C. E., 2006). Ефекта на опиоидите върху системите на асоциативна памет обуславя късния рецидив на употреба на опиоиди, който може да възникне неочаквано при ситуации свързани със спомена за неговата употреба (DiChiara, G., North, R. A., 1992). Активирането на опиоидните μ -

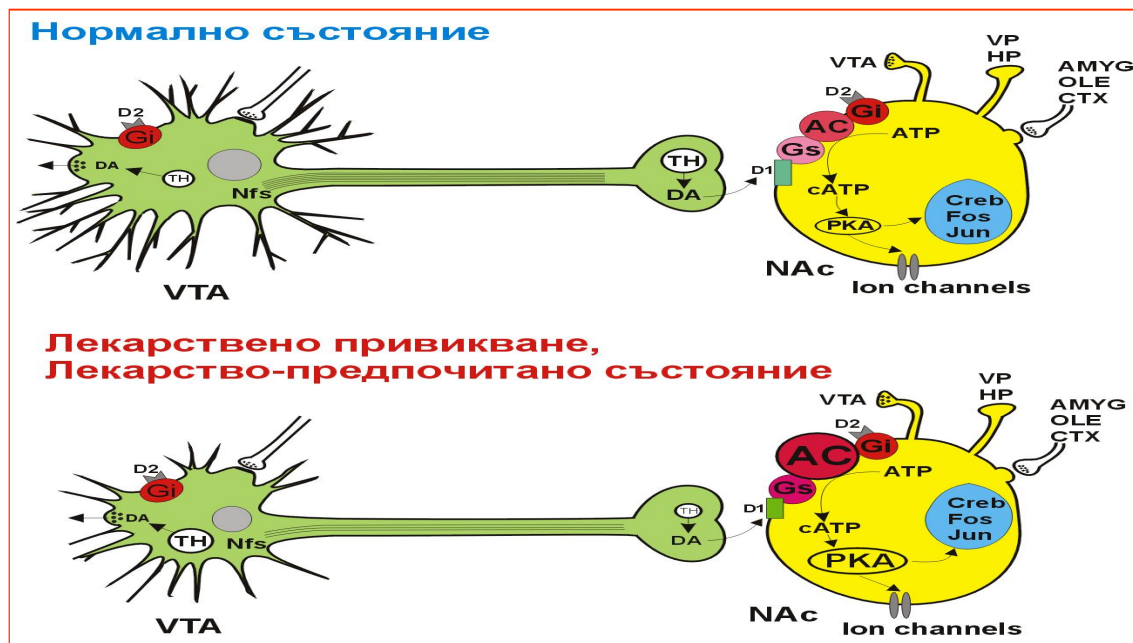
и δ - и допаминовите D_2 - рецептори потиска синтезата на cAMP чрез G_i - и G_0 -протеини и cAMP-зависими реакции на фосфорилиране в клетката, което води до потискане на невротрансмитерната секреция и спайковата активност (Self, D. W., Nestler, E. J., 1998).

Експериментални данни показват, че прилагането на μ -агонисти инхибира волт-зависимите Ca^{++} канали, кортикалната секрецията на глутамат и евокирания Ca^{++} инфлукс (Vlaskovska, M., et al., 1997). Представени са редица данни, че опиоидната активация на фосфолипаза C (PLC) потенцира NMDA-медиирания Ca^{++} инфлукс посредством дезинхибиция на NMDA рецепторите, което резултира в т. н. "wind-up" феномен на непрекъснато засилване на отговора спрямо следващи идентични стимули. Тази каскада е основен молекулен механизъм отговорен за развиването на толерантност (Smart, D., Lambert, D. G., 1996). В експерименти с първични култури от кортикални неврони е установено, че острото третиране с μ -агонисти индуцира активност на транскрипционните фактори AP-1 и NF-kB (Hou, Y-N., et al., 1996). Активността на тези нуклеарни фактори се индуцира също и от глутамат (Kaltschmidt, C., et al., 1995). AP-1 и NF-kB регулират генната експресия на продинорфин и проенкефалин, цикло-оксигеназа-2, iNOS, както и голям брой цитокини, които са въввлечени в имунния отговор (O'Neill, L. A. J., Kaltschmidt, C., 1997). Популярен е възгледа, че „паметта“ на имунните клетки и имунните реакции представляват „аналог“ на процесите на опиоидна зависимост и рецидив. Този възглед се подкрепя и от данните, че опиоидите са потентни модулатори на имунните отговори (Yaksh, T. L., Wallace, M. S., 2011). При хронично третиране с опиоиди настъпват промени, които спомагат за връщане към изходното ниво на потиснатата невронална активност (Christie, M. J., 2008). Непреодолимия стремеж за набавяне на опиоид по време на абстиненция се обяснява с намалената секреция на DA в nAc и VTA и понижените нива на ендогенни опиоиди

(Self, D. W., Nestler, E. J., 1995). Прието е, че хроничното третиране с опиоиди води до инхибиране на $G_{i\alpha}$, което резултира в постепенно повишаване на АС-активността (адаптивна реакция на инхибиторното действие на опиоидите). По този механизъм хроничното третиране с морфин води до повишаване на нивото на сАМР-зависима протеинкиназа (РКА) и на други фосфопротеини, вкл. тирозинхидроксилаза (ТН), която е скорост-лимитиращо звено в синтеза на катехоламини. Субстрати за действието на РКА са йонни канали и редица нуклеарни транскрипционни фактори, между които са CREB (cyclic AMP response binding element), който медира ефектите на сАМР-сигналния път върху генната експресия, AP1-активиращ протеин, който регулира голям брой гени, включително тези отговорни за синтеза на проенкефалин и продинорфин. На тези промени могат да се дължат наблюдаваните при опиоидна зависимост изменения във фенотипа на зависими пациенти (Self, D. W., Nestler, E. J., 1995).

Описаните промени са основание за терапия с използваните понастоящем подходи за купиране на абстиненция. При абстиненция третирането с клонидин, агонист на α_2 -адреноцепторите, включва идентичен на морфиновия пострецепторен механизъм, т. е. хиперполяризация на норадренергичните неврони и инхибиция на секрецията на норадреналин. Клонидин и NMDA антагонистите, потискат засилената по време на абстиненция експресия на c-Fos, който е структурен компонент на AP-1 протеина (Rasmussen, K., al., 1995). Увеличената АС активност при абстиненция може да бъде понижена от невролептици, инхибиращи предимно допаминергични D_1 -рецептори. Известно е, че допаминергичните D_1 -рецептори в nAc са куплирани към АС чрез стимулиращи G_s -протеини. Невролептиците може да потиснат агресивността и психотичната компонента при абстиненция, но не могат да потиснат непреодолимото желание за приемане на опиоид (craving). Това състояние се потиска с опиоид и / или антидепресанти, инхибиращи

невроналния ъптейк на допаминовия. Симплифицирана схема на адаптивните промени, които настъпват в nAc и VTA при опиоидна зависимост е представена на Фиг. 4. 9.



Фигура 4. 9. Адаптивни промени в невроните на nAc и VTA при опиоидна зависимост

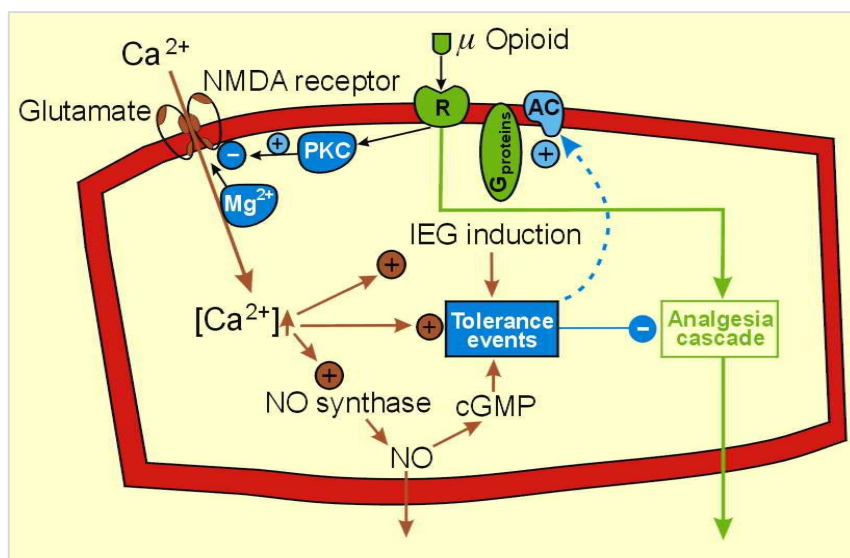
Показано е, че при остро прилагане на опиоиди нивото на Ca^{++} йони в синаптозомите се понижава. В контраст на това при хронично прилагане на опиоиди нивото на Ca^{++} йони в синаптозомите се повишава и нарастват броя и чувствителността на дихидропиридин-свързващите места в хипокампални неврони. В изследвания върху култури от кортикални неврони е установено, че блокери на Ca^{++} канали променят броя и афинитета на опиоид-свързващите места след хронично третиране с морфин (Surcheva, S., et al., 1995). Тези промени се наблюдават при поява на толерантност към аналгетичния ефект на опиоидите и развитие на физическа зависимост. Установено е, че при абстиненция секрецията на глутамат се увеличава, което води до невротоксични и конвулсивни реакции (Aghajanian, G. K., et al., 1994). Значителни структурни промени, които са доказателство за настъпили увреждания на невроните, са наблюдавани във VTA.

Специфични за тази зона са намаляване на неврофиламентните протеини и увеличаване на киселия глиален фибрилерен протеин, които се асоциират с блок на аксоплазмения транспорт от VTA към nAc в допаминергичните и опиоидергичните неврони (Self, D. W., Nestler, E. J., 1995). В експерименти *in vivo* е установено, че при абстиненция нивата на ендогенните опиоидни пептиди са различни при нормалните и генетично-предразположените към авто-третране с опиоиди животни (Nylander, I., et al., 1995a, b). Недостига на екзогенен наркотик на фона на описаните промени обуславя дефицит в активността на VTA с типичните за това прояви на дисфория и непреодолим стремеж за набавяне на наркотик. С това се обяснява трудното повлияване от други лекарствени средства на психичния компонент в зависимостта и абстиненцията. Основния терапевтичен подход засега се заключава в продължително (6-12 месеца) лечение с понижаващи се дози на метадон или левометадил ацетат, които са по-слаби и по-продължително действащи опиоидни μ -агонисти. Доказано е, че своевременната терапия с тези лекарства води до постепенно обратно развитие на настъпилите неврохимични и невроморфологични изменения (O' Brien, C. P., 2011). Лечението на зависимостите към опиоиди може да бъде оптимизирано с антагонисти на NMDA-рецепторите, които блокират хипертрофиралата глутаматергична трансмисия и DA ъптейк, от което непреодолимия стремеж към наркотика (craving) намалява.

Когато пациентите са “изчистени” от наркотик може да бъде проведено лечение с опиоидни антагонисти (налуксон, налтрексон). Антагониста блокира μ -рецепторите и ендогенните опиоидни пептиди не могат да предизвикат ефект на възнаграждение и пациента изпитва аверзивни усещания. Понастоящем масово се прилага Buprenorphine който е парциален μ -агонист, т. е. отслабва / блокира ефекта на опиоида, но поради слабия и краткотраен агонистичен ефект не предизвиква абстиненция.

5.1 Нитроксидаергична модуляция

Активирането на NMDA-рецептори засилва Ca^{++} инфлукс и активира синтеза на азотен оксид (NO), който действа като ретрограден невротрансмитер, засилващ секрецията на глутамат. Следователно, промени в ендогенните нива на NO могат да допринасят за предизвиканото с NMDA антагонисти намаляване на толерантността към аналгетичния ефект на морфин (Elliott, K., et al., 1994). Симплифициран модел на основните взаимодействия между опиоидергични, глутаматергични и нитроксидаергични трансмитерни системи са представени на Фиг. 5. 10.



Фигура 5. 10. Нитроксидаергични, глутаматергични и опиоидергични взаимодействия при толерантност към аналгетичния ефект на опиоидни μ -агонисти (Цитирана по Elliott, K., et al., 1994)

Азотният оксид се генерира от аргинин (L-Arg) от ензима NO синтаза (NOS). В организма на бозайници се верифицират най-малко три изоформи на NOS. Конститутивна калций / калмодулин-зависима NOS в нервната система (nNOS), която участва в трансдукцията на нервните сигнали, индуцируема калций-независима NOS в макрофагите (iNOS), която участва в различни форми на клетъчния имунитет и конститутивна калций/ калмодулин-зависима NOS, която участва в регулацията на кардиоваскуларните функции (eNOS). Конститутивната NOS се активира с

къс латентен период и генерира NO в наномоларни концентрации, които медираат физиологични „полезни“ нитроксидергични процеси. Индуцируемата NOS се активира с дълъг латентен период (Moncada et al., 1991) и генерира NO в микромоларни концентрации, които медираат патологични „цитотоксични“ ефекти. Освободен от клетката NO съществува за късо време като NO[•], след което се превръща ONOO⁻ и ONOON и се аактивира в нитрат, нитрит или се свързва с хем в молекулата на хемоглобина. Без да се натрупва в целуларните структури NO се освобождава от клетката, дифузира през клетъчната мембрана, разпространява се в екстрацелуларното пространство и свободно прониква през мембраната на околните клетки до които достига. В таргетните клетки NO стимулира разтворимата гуанилил циклаза (GC). Генерирания cGMP активира различни протеин-кинази, циклични фосфодиестерази, йонни канали и протеини. Крайният ефект е понижаване на интрацелуларната концентрация на свободни Ca-йони в таргетната клетка. Действието на NO може да бъде резюмирано в следното:

- NO е медиатор на васкуларната релаксация и е фактор за хомеостазата в съдови области в мозъка, белите дробове и сърцето
- NO е невротрансмитер, секретирани в отговор на активиране на глутаматергични NMDA рецептори и е фактор за ретроградната сигнализация в нервната система
- NO е продукт на макрофагите, с който елиминират чужди за организма клетки (бактериални, туморни) и играе роля на основен фактор на имунната защита

5.2 Нитроксидергични процеси и целуларен имунитет

Три изследователски колектива почти едновременно показаха, че макрофагите синтезират NO от L-Arg (Hibbs, J. B., et al., 1988, Marletta, M. A., et al., 1988, Stuehr, D. J., Nathan, C. F., 1989). Синтезът се катализира от

iNOS и продължава до изчерпването на наличния субстрат или до настъпването на смърт на клетката. Процесът може да бъде потиснат както от структурни аналози на L-Arg, които инхибират и другите изоформи на NOS, така и от специфични за iNOS инхибитори. Макрофагите се активират от цитокини, либерирани от лимфоцити сензитизирани от специфични антигени. Активираните макрофаги упражняват неспецифично цитотоксично действие, което е независимо от фагоцитозата и може да бъде както цитостатично, така и цитолитично. Приложението на NOS-инхибитори блокира активността на макрофагите. На базата на тези и подобни изследвания понастоящем се възприема становището, че освободения от макрофаги NO представлява основния краен защитен механизъм срещу бактериални или хелминтни инвазии (Nathan, C., 1992). Механизма на това защитно действие се обяснява с подтискане на DNA-репликацията в чуждия агент. L-Arg - NO системата функционира като защитен механизъм и в неутрофилните левкоцити. Доказано е, че при химическа или бактериална атака неутрофилите генерират и секретират NO и този ефект се блокира от NOS инхибитори (McCall, T. B., et al., 1991).

5.3 Нитроксидергични процеси и опиоидна толерантност/зависимост

Установено е, че NOS инхибитори облекчават синдрома на абстиненция при зависимост от морфин и забавят настъпването на толерантност към аналгетичния ефект на морфин (Cappendijk, S. L. T., al., 1995). Трябва да се отбележи, че NOS-инхибиторите нямат еднопосочни ефекти върху всички симптоми на абстинентния синдром. Естерните аналози на L-Arg (L-Nitro-arginine methyl ester, NAME) инхибират кардиоваскуларните прояви и нямат ефект върху поведенските симптоми, докато неестерните аналози на L-Arg (L-Nitro-arginine, L-Monomethyl-

arginine) имат противоположни ефекти (Vucsafulco, J. J., et al., 1995). Други автори съобщават, че NAME не повлиява морфин-индуцираната аналгезия (Majeed, N. H., et al., 1994). Независимо от нюансите всички тези резултати показват ясно, че NO участва в реализирането на опиоидните ефекти. Предлаганите хипотези за действието на NOS-инхибитори или NO-донори върху опиоидните толерантност и зависимост могат да бъдат сведени до ефекти на NO върху различни невротрансмитерни процеси. Действието на морфин върху глутаматергични NMDA рецептори в ЦНС активира NO синтезата. Този NO стимулира ТН и секрецията на норадреналин и допамин в системата за възнаграждение и на ацетилхолин в автономните ядра на ЦНС, което по директен или индиректен механизъм отново активира NMDA-чувствителни процеси като затваря един кръг на ексцесивно активиране на процесите в системата за възнаграждение. Възникването на абстинентен синдром се свързва с хипофункция във всички тези цикли. Тази концепция е в хармония с данните, че NMDA-рецепторни антагонисти блокират опиоидната толерантност, а съчетаването на морфин с NOS-инхибитори превантира развитието на толерантност, което според едни автори е специфично само за μ -опиоидни агонисти (Babeu, A. M., al., 1994, Bhargava, H. N., Thorat, S. N., 1996).

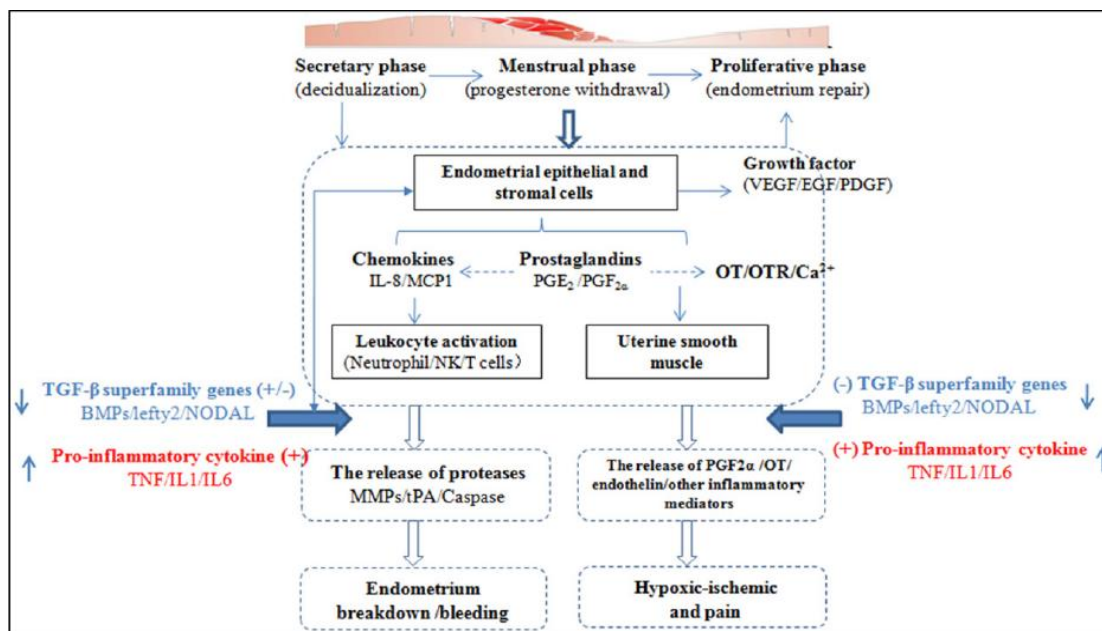
6. ДИСМЕНОРЕЯ. БОЛКОВ СИНДРОМ

Дисменореята е синдром свързан с менструалния цикъл на жената, в който доминиращия симптом е висцерална болка с различни интензивност и времетраене. Болката може да се появи с менструацията или да започне 1-3 дни по-рано, става максимална след 24 часа и отминава след 2-4 денонощия (Pinkerton, J., 2015). В зависимост от етиологията дисменореята е първична, при която липсва причинно-следствена връзка с друго болестно състояние, или вторична, когато е предизвикана от друго болестно състояние като ендометриоза, вродени утерусни аномалии, ектопична бременност и други (Berkley, K. J., 2013). Първичната дисменорея се характеризира с интензивна тазова спастична болка, която ирадира към лумбалната зона и горната част на бедрата и много често е придружена от гадене, повръщане, главоболие (Dawood, M. Y., 2006). Първичната дисменорея е извънредно честа и в глобален план се наблюдава в над 90 % от девойките и 50 % от жените с менструален цикъл, като за 12-15 % от тях представлява стресиращо и болезнено състояние (Fedorowicz, Z., et al., 2013) и възпрепятства извършването на ежедневните дейности (Latthe, P. M., et al., 2011). Изненадващо е, че оплакванията при дисменорея са игнорирани неоправдано както от клиницисти, така и от изследователи, независимо от факта, че те силно влошават качеството на живот на повече от 25 % от всички жени в репродуктивна възраст (Weissman, A. M., et al., 2004). Анализ на данни от PubMed и ScienceDirect при използвани ключови думи „болка“ и „дисменорея“ показва, че дисменореята е предмет на проучването в по-малко от 0.1 % от публикациите, при което в специализирани списания по болка са публикувани под 3 % от всички публикации (Berkley, K. J., 2013). В САЩ през 2013 г финансираните научни проекти за изследвания на

дисменорея са по-малко от 0.3 % от всички финансирани проекти за изследвания на болката (Berkley, K. J., 2013). Очевидно е, че синдрома дисменорея не трябва да бъде подценяван от пациентки и клиницисти. Напоследък се лансира становището, че подценяването на синдрома дисменорея в млада възраст може да допринесе за хронифициране на болката в следващите години, което налага да бъдат направени промени в подходите за възпитание и лечение на младите момичета (Wesselmann, U., 2008).

6.1 Патопфизиологични механизми

В повечето случаи на първична дисменорея се касае за функционални отклонения без придружаваща гинекологична патология. Менструацията настъпва след понижаване на прогестероновите нива и зависи от много комплицирани взаимозависимости между овариалната секреция, различни имунни фактори и невротрансмитерни процеси. След овулация нивата на фосфолипиди и арахидонова киселина в целуларната мембрана нарастват. Това стартира синтеза на простагландин PG F2 α (Chan, W. Y., Hill, J. C., 1978) и левкотриен LT E4 (Rees, M. C. P., et al., 1987) в миометриума, които предизвикват контракции на миометриума и силна вазоконстрикция. Заедно с тях се освобождават многобройни медиатори на възпалението и по този начин се разгръща богата клинична изява на синдрома дисменорея (Harel, Z., 2008). Има убедителни доказателства, че при дисменорея в тъканите на утеруса има намалена експресия на iNOS се синтезира по-малко NO (Cameron, I. T., Cambell, S., 1998), което също предизвиква силна вазоконстрикция. Схема на главните патогенетични процеси, предизвикващи дисменорея са представени на Фиг. 6. 1.



+ активиране, - инхибиране, ↑ up-регуляция, ↓ down-регуляция, BMP костен морфогенетичен протеин, IL-1 интерлевкин 1, IL-6 интерлевкин 6, IL-8 интерлевкин 8, MCP 1 моноцитен хемотаксен протеин, MMP матриксни металопротеинази, NK неврокинин, OI окситоцин, PDGF тромбоцитен растежен фактор, PGE₂ простагландин E₂, PGF_{2α} простагландин F_{2α}, TNF-β трансформиращ растежен фактор β, TNF тумор некротичен фактор, TPA тъканен плазминоген активатор, VEGF васкуларен ендотелен растежен фактор

Фигура 6. 1. Патогенетични механизми на дисменореята
(Цитирана по Berkley, K. J., 2013)

Предизвиканите исхемия на миометриума и деструкция на ендометриума водят до освобождаване на екстрацелуларен АТР, който активира P₂X_{2/3} пуриноцептори, разположени по сетивните нервни терминали в утеруса (Burnstock, G., 2001). Синергично действие имат освободените при дисменорея многобройни алгогенни субстанции, които активират разположените по ноцицептивните терминали специфични рецептори. Описаните процеси представляват принципните трансдукционни механизми на болката при дисменорея. Това съвпада с концепцията, че констелация от пуринергични, кининергични, пептидергични, ейкозаноидни и нитроксидергични трансмитери, рецептори и модулатори осъществява ноцицептивните трансдукционни механизми на висцералната болка (Bielefeldt, K., Gebhardt, G. F., 2006). Все повече се утвърждава становището, че дисменореята не е само гинекологично

страдание. Клинични и експериментални данни показват, че жени с дисменорея имат дълбока мукулна хипералгезия (Giamberardino, M. A., 2008), чести депресивни състояния и смущения в съня (Iakovides S., et al., 2015). В други изследвания е установено, че жени с дисменорея имат понижени нива на кортизол в серума, което корелира с давността на дисменорея (Vicent, K., 2011). fMRI данни доказват, че при жени с дълга анамнеза за дисменорея имат промени в обема на редица мозъчни структура ангажирани с перцепцията на болка (Tu, C. H., et al., 2010). Същите автори с PET изследвания установяват, че глюкозния метаболизъм в обширни зони на соматосензорния кортекс е понижен (Tu, C. H., et al., 2009).

6.2 Фармакотерапия

Третирането на болезнена дисменорея започва със симптоматични средства. Най-напред това са адекватни почивка и сън и редовни физически упражнения. Наред с това се налага спазване на бедна на мазнини диета, суплементирана с хранителни добавки богати на ω -3 мастни киселини, магнезий, цинк, Vit. B1 и Vit. E (Pinkerton, J., 2015). Фармакотерапевтично средство на избор са НСПВС като специфични COX 2 инхибитори са предпочитани. Лечението с НСПВС трябва да започне 1-2 дни преди менструация (Berkley, K. J., 2013). Тривиална схема на фармакотерапевтично третиране при дисменорея, възприета в САЩ за стандарт за третиране с НСПВС е илюстрирана в Табл. 6. 1.

Табл. 6. 1. Фармакотерапия на първична дисменорея с НСПВС

НСПВС	Дозировка и дозов режим
Ibuprofen	начална 200 - 600 mg, след това 200 - 400 mg през 6 h
Naproxen	начална 440 - 550 mg, след това 220 - 275 mg през 8 h
Mefenamine	начална 500 mg, след това 250 mg през 6 h
Celecoxib	начална 400 mg, след това 200 mg през 12 h

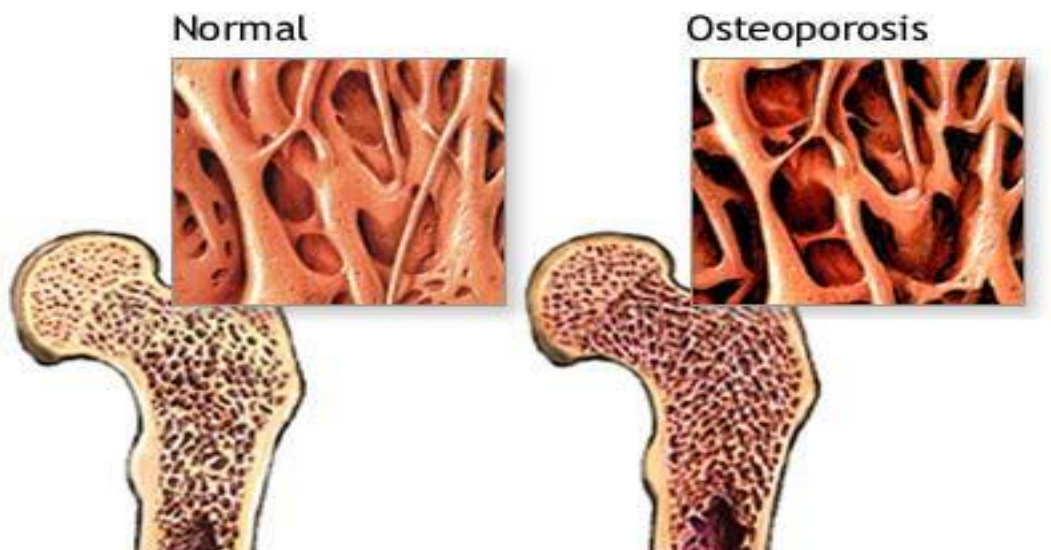
Когато терапията с НСПВС не е ефикасна се прилагат перорално комбинирани лекарствени продукти от естрадиол и прогестерон. Ако при това третиране оплакванията продължават при следващите три цикъла може да се допусне вторична дисменорея (Harel, Z., 2008). В обобщен вид прилаганите фармакотерапевтични подходи за третиране на дисменорея са представени в табл. 6. 2.

Таблица 6. 2. Фармакотерапевтични подходи при дисменорея

Ефективни	Вероятно ефективни	Несигурно ефективни
НСПВС (без Аспирин)	Аспирин, парацетамол Противозачатъчни Витамини В1, В6, Е	Магнезий, Гестагени Витамин В12

7. ОСТЕОПОРОЗА

Остеопорозата представлява прогресиращо системно заболяване на костната система, при което настъпват загуба на костна тъкан и разрушаване на костната микроархитектура (World Health Organization, 1998). Тези патологични процеси намаляват здравината на костта и увеличават значително риска от фрактури при минимална травма. Когато липсват фрактури единствен алармиращ симптом на тази „тиха“ болест е болка. Верифицирана по костната плътност на фемуралната кост, остеопороза е диагностицирана в 18 - 24 % от жените и 6 - 22 % мъжете по-възрастни от 55 години, рекрутирани в многопластово ретроспективно проучване (Cummings, S. R., Melton, L. J., 2002). Терминът *остеопороза* означава намаление на костната маса с деструкция на микроархитектурата. Терминът *остеопения* означава деминерализация на костната микроархитектура. Типични промени на микроархитектурата на фемуралната кост при остеопороза са илюстрирани на Фиг. 7. 1.



ADAM.

Левия панел илюстрира микроархитектурата на фемуралната кост при норма
 Десния панел илюстрира микроархитектурата на фемуралната кост при остеопороза

Фигура 7. 1. Микроархитектура на pars compacta и pars spongiosa на фемуралната кост при норма и остеопороза

Остеопороза настъпва след 50 годишна възраст като най-застрашени са жените след менопауза (Levine, J. P., 2007). Честотата на заболяването нараства по-стръмно при жените поради бързо настъпващия при менопауза дефицит на естрогени и по-голямата продължителност на живота при тях. Според аргументирани прогнози броя на жените по-възрастни от 65 години ще се увеличи от 188 милиона през 1990 година на 325 милиона през 2015 година (World Health Organization, 1998). Остеопорозата е най-честата причина за фрактури на проксималната фемурална кост, дисталната радиусна кост или на телата на гръбначните прешлени и е главен фактор за влошеното качество на живот при много голям брой пациенти в напреднала възраст (Friedman, P.A.,2011). Понастоящем риска за различни фрактури на костите вследствие остеопороза е над 35 %. Според достоверни предвиждания броя на пациентите с остеопороза и фрактура на фемуралната кост ще нарасне от 1.3 милиона през 1990 година на 6 милиона през 2015

година (World Health Organization, 1998). Наред с медицинските предизвикателства, това ще представлява сериозен финансов проблем за системите на здравеопазване във всички страни. Според етиопатогенезата са дефинирани първична, идеопатична, тип I остеопороза и вторична, сенилна, тип II остеопороза. Тип I се проявява след менопауза с бързо настъпваща загуба на костна маса в трабекуларните кости и инцидентни фрактури на гръбначните прешлени, тибиялната или радиусна кости. Тип II сенилна остеопороза е предизвикана от хроничен дефицит на калций, високи нива на паратиреоиден хормон (PTH) и намалена остеосинтеза (Pereira et al., 2002). В клиничната практика е известно, че ревматологични възпалителни заболявания като ревматоиден и псориазен полиартрит, анкилозиращ спондилит и други са ко-морбидни с остеопороза (Maruotti, N., et al., 2014). Освен това кортикостероидната терапия увеличава значително риска за развитие на остеопороза (Fardet, L., et al., 2011).

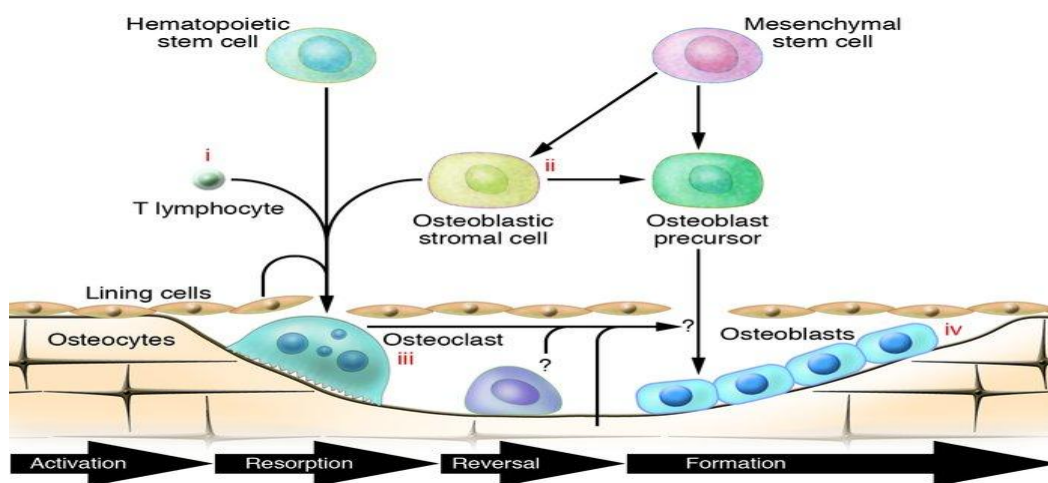
7.1 Патофизиологични механизми

Костите са композирани от минерализиран матрикс и активен целуларен компонент и изграждат централните и периферни части на скелета. Костната маса в периферните кости е над 80 % съсредоточена в компактна кортикална кост. Централните кости в гръбначния стълб и таза имат голяма трабекулна и малка компактна костни маси. Кухините между трабекулите са изпълнени с хемопоеични и мастни клетки. Промените в костната обмяна се проявяват най-рано в централните кости, тъй като в трабекулните зони са съсредоточени зони за ремоделиране на костта и прекурсорни клетки на костния мозък, играещи важна роля в костния обмен (Friedman, P. A., 2011). *Костна маса:* Физиологичното формиране на костната маса завършва в общ вид до 17 годишна възраст при момчетата и 20 годишна възраст при момчетата, достига максимална осификация до 30 -

35 годишна възраст и след 50 годишна възраст започва прогресивно да намалява. Най-важните фактори, които регулират развитието на костната система са двигателната активност, ендокринния репродуктивен статус и калциевата обмяна, но дефицита на всеки един от тях не може да бъде компенсиран с ексцес на останалите (Friedman, P. A., 2011). *Ремоделиране на костта*: Нарастването и развитието на ендохондриалната костна маса е процес на моделиране на костта. Веднъж изградена костна маса е подложена на непрекъснато разграждане и ново изграждане на костта, представляващи процес на ремоделиране, чрез който костната архитектура се адаптира към натоварванията (Vallock, R. T., O'Keefe, R. J., 2003). Ремоделирането става на повърхността на костта, над 90 % от която е неактивна и покрита с фин слой клетки. В отговор на механични или биохимични стимули прекурсорни клетки от костния мозък се включват към повърхностния слой на костта като се превръщат в полинуклеарни остеокласти, които резорбират костната маса и екскавират кухини в костта. Генезата на остеокласти се регулира от IL-1 и IL-6, които се продуцират от остеобластните клетки (Suda, T., et al., 1999). Костната резорбция зависи от експресията на рецептора за активиране на нуклеарния фактор NF-κB (RANK) по остеобластната мембрана и ендогенния лиганд на този рецептор (RANKL). При свързване с рецептора RANKL индуцира диференциация на остеобластните прекурсори и формирането на остеокласти (Khosla, S., 2001). Остеобластите продуцират osteoprotegerin (OPG), който действа като лъжлив аналог на RANKL. При естроген-депривация OPG намалява, RANK свързва RANKL, което предизвиква увеличена продукция на остеокласти. При хормон заместваща терапия (HRT) с естрогени нивото на OPG нараства и конкурентно на RANKL се свързва с RANK, т. е. понижава продукцията на остеокласти, респ. резорбцията на костна маса. Има данни, че OPG е по-ефикасно от бисфосфонати потиска костната резорбция (Morony, S., et al., 2005). След завършване на фазата на резорбция започва инвазия на пре-osteобласти,

получени от стромни клетки на костния мозък, които се локализируют по основата костния кавитет, получен в процеса на остерезорбция. Тези клетки диференцират в остеобласти и започват да продуцират колаген и остеокалцин които са основните конституенти на нова кост, която да замести резорбираната.

Симплифицирана схема на целуларната динамика при ремоделиране на костната микроархитектура е илюстрирана на Фиг. 7. 2.

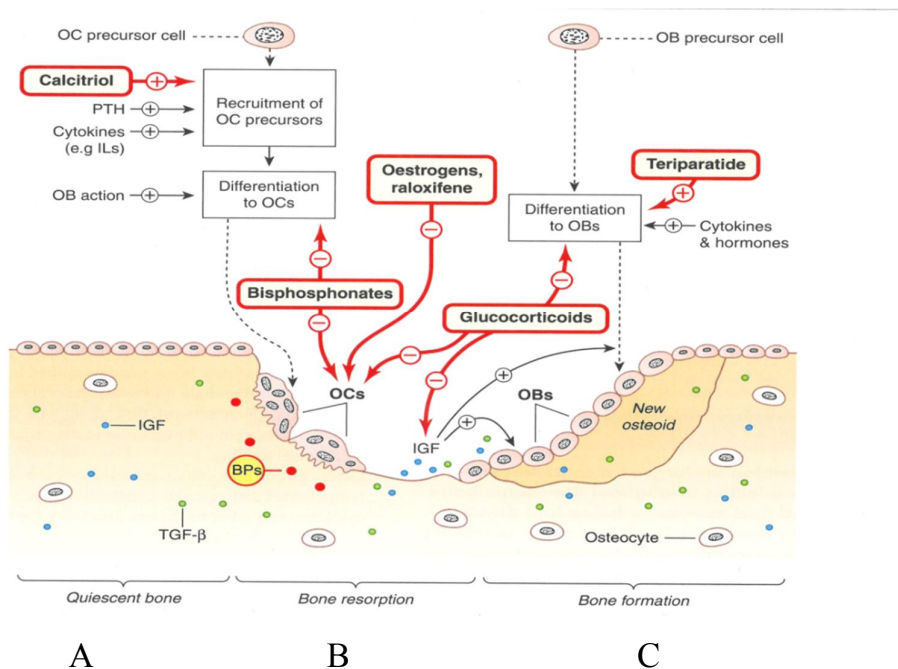


Фигура 7. 2. Целуларна динамика при ремоделиране на костната микроархитектура

Когато дебелината на образувания остеоид стане 20 μm започва неговата минерализация. При нормални условия за един цикъл на ремоделиране са необходими около 6 месеца (Friedman, P. A., 2011). Резорбцията на костта от остеокластите отнема по-малко време, отколкото възстановяването на костната маса от остеобластите. Затова може да се допусне, че ускоряване на ремоделирането ще предизвика загуба на костна маса. Теоретично би могло да се допусне, че резорбираната костна маса е изцяло възстановена при ремоделиране. В действителност обаче, динамиката на процеса на ремоделиране е такава, че след всеки цикъл остава малък костен дефицит, който с възрастта се натрупва и предизвиква

т. н. *възрастна остеопороза*. Промени в процеса на ремоделиране са основните механизми, чрез които хранителен, хормонален или двигателен дефицити, и лекарства изменят баланса в костната система. Динамиката на ремоделиране може да бъде стимулирана от хиперактивност на тиреоидната и паратиреоидни жлези или хипервитаминоза D. Противоположен ефект върху ремоделирането на костта имат дълготрайна кортикостероидна терапия, алкохол или тютюнопушене. Процесът на ремоделиране е потиснат най-силно у жените. При жени с естрогенов дефицит, предизвикан от менопауза или патологични процеси в хормоналната репродуктивна система резорбтивния капацитет на остокластите нараства силно, което резултира в развитие на остеопороза (Manolagas, S. C., et al., 2002).

Структурната и функционална динамиката на процеса на ремоделиране и насоки за фармакологично повлияване са представени на Фиг. 7.3.



Фигура 7.3. Структурна и функционална динамика на процеса ремоделиране на костната микроархитектура, таргети и представителни лекарствени продукти, използвани за тяхното фармакологично повлияване (Цитирана по Rang, H. P., et al., 2007)

А фаза на покой (възстановена кост). IGF се експресира в целия костен матрикс. **В фаза на остеорезорбция** (активност на остеокласти). Мобилизирани ОСs се придвижват към възстановена кост, резорбират костната маса и секретират различни цитокини. **С фаза на остеосинтеза** (активност на остеобласти). Секретираните цитокини активират остеобласти (OBs), които „облицоват“ с остеоид и цитокини кухините от остеорезорбция. Секретирания IL-6 активира ОСs. Остеоидната покривка се минерализира и „тапицира“ кухините с нова кост. Естрогените предизвикват апоптоза на остеокластите като стимулират експресията на TGF- β . Във фармакологични дози глюкокортикоидите инхибират, докато във физиологични концентрации стимулират диференциацията на OBs.

BMP костен морфогенен протеин, IGF инсулин-подобен растежен фактор, OBs остеобласти, ОСs полинуклеарни остеокласти, PTH паратиреоиден хормон, TGF- β трансформиращ растежен фактор β

7.2 Фармакотерапия

Фармакотерапията на остеопорозата може да бъде симптоматична, заместителна или етиопатогенетична. Лечението на остеопорозата при възрастни пациенти с повишен риск от фрактури намалява риска от тях със 70 % (Crandall, C. J., et al., 2014). *Симптоматичното лечение* с аналгетични лекарствени продукти (Виж: Глава 4) се прилага на пациенти, при които остеопоротични изменения на костите са причина за ноцицептивни или невропатни болкови синдроми. Фармакотерапията на първичната остеопороза при менопауза е заместителна и / или етиопатогенетична. Менопаузата е квази-физиологично състояние на женския организъм при естрогенов дефицит последица на затихващата активност на репродуктивната ендокринна система. Проявява се с богата клинична симптоматика, в която доминират аверзивни соматични и психични прояви. Прилагането на *хормон-заместваща терапия (HRT)* с естрогени е средство

на избор за облекчаване на симптомите и превенция на остеопоротични промени в костите при менопауза. HRT предизвиква сериозни нежелани лекарствени реакции. Най-сериозните нежелани реакции са увеличен риска от карцином на матката и млечните жлези, тромбоемболизъм и менорагия (Rang, H. P., et al., 2007). Като алтернатива понастоящем масово се прилага *HRT с фитоестрогени*, които не предизвикват нежеланите усложнения от HRT с нативни естрогени, от които най-употребявани са фитопродукти от соя. Засега масово приложение имат лекарствени продукти на растителна основа, в които активния принцип е Genistein и Genistin. Установено е, че растежа и минерализацията на остеообласти увеличава 9 пъти експресията на естрогенен рецептор- β (ER- β) без да променя експресията на ER- α (Arts, J., et al., 1997). Клинични изследвания показват, че Genistein, който е селективен агонист на ER- β , понижава отношението sRANKL / OPG (Marini, H., et al., 2008) и увеличава костната плътност (Bitto, A., et al., 2011). Обстойно ретроспективно проучване показва, че в последното десетилетие са изследвани 69 растения и 46 съединения изолирани от растения, които имат значителен терапевтичен потенциал за превенция на остеопороза с фитопродукти (Pereira, J. V., et al., 2002).

За нас тази проблематика е от значителен интерес. Вниманието ни е насочено към изследване на фитопродукти с естроген-подобно действие, които могат да имат терапевтичен потенциал за профилактика и лечение на пост-менопаузна остеопороза. В този контекст фитопродукти получени от целина (*Apium graveolens*, *Apium nodiflorum*), която е растителен вид познат със своите кулинарни и лечебни качества, може да бъде подходящ обект на фитохимични и фармакологични изследвания. Освен алкохолния екстракт от целина, трябва да се спомене и етанолният екстракт от коренище на растението *Cimicifuga racemosa* L., регистриран под търговските имена Cefakliman Klimadynon и Remifemin за облекчаване на постменопаузални оплаквания (Ламбев, Ив. *Selecta medicamentorum*, Сдружение „ПНР“ - София, 2015, 385). С фитохимични анализи на части или продукти от целина

е показано, че в тях се съдържат многобройни химични съединения, представляващи различни групи вторични метаболити. Установени са високи концентрации флавоноиди (Miean, T., Mohamed, S., 2001), полифеноли (Nikolic, N., et al., 2011), фталиди (Beck, J. J., Chou, S.-C., 2007), кумарини (Ataga, A. E., et al., 1993), терпени, (Zhou, K., et al., 2009). Целината съдържа етерични масла (1.5-2 %), витамини (А, В₁, В₂, С, К), микроелементите Са, Mg, Fe, К, Na, Р и други (Shad, A. A., et al., 2011). Експериментални и клинични данни показват, че продукти от целина предизвикват многобройни и разнообразни ефекти върху здравословното състояние. Има данни, че алкохолни екстракти от целина имат хепатопротективно (Bahar, A., et al., 2002), деслипидемична (Tsi, D., et al., 1995), про-апоптозна (Subhardradevi, V., et al., 2011), антипролиферативна / антинеопластична (Sultana, S., et al., 2005) активности. В по-ранни изследвания е показано, че *Apium* има анти-инфламаторно (Atta, A. E., Alkofahi, A., 1998), антимикубно (Sipailiene, A., et al., 2005) и фунгицидно действие (Momin, R. A., Nair, M. G., 2001). В цитираните фитохимични изследвания са верифицирани значителни концентрации на апигенин, лутеолин, кемпферол, кверцетин, р-кумарова, ферулова, кафеена киселини, псорален, ксантотоксин, бергаптен. Освен алкохолния екстракт от целина, трябва да се спомене и етанолният екстракт от коренище на растението *Cimicifuga racemosa* L., регистриран под търговските имена Cefakliman Klimadynon и Remifemin за облекчаване на постменопаузални оплаквания (Ламбев, Ив. *Selecta medicamentorum*, Сдружение „ПНР“-София, 2015, 385). В наличните източници не открихме данни за използването на целина за профилактика и терапия на остеопороза. *Механизъм-насочената фармакотерапия* на менопаузната остеопороза включва различни групи лекарствени продукти, които повлияват основните звена в патогенезата на болестта. Този клас включва (i) бисфосфонати, (ii) селективни ER-модулатори, (iii) анти-RANKL хуманизирани моноклонални антитела, (iv) анаболни средства, (v) паратиреоиден хормон, витамин D₃, калций,

стронций, (vi) комбинирани средства. Най-широко приложение за профилактика на менопаузната остеопороза имат първите три групи лекарства, т. н. антирезорбтивни средства, които забавят костната резорбция като потискат функцията на остеокластите. Бисфосфонатите, т. н. дронати (Alendronate, Ibandronate, Risedronate, Zoledronate) са лекарствени продукти от „*първа линия*“ при профилактика / лечение на остеопороза. Тези лекарства се акумулират в минерализираната повърхност на костта, интернализират се в остеокластите, инхибират тяхната функция и така за продължително време намаляват костната резорбция (Lim, S. Y., Volster, M. V., 2015). Показано е също, че бисфосфонатите могат да индуцират апоптоза в остеокластите (Хи, Х. L., et al., 2013). Установено е, че след преустановяване на терапията с бисфосфонати костната резорбция и риска от фрактури остават понижени в течение на 5 до 9 години (Black, D. M., et al., 2012). Напоследък се приема, че е необходимо много внимателно преценяване на индикациите за продължително третиране с антирезорбтивни лекарства поради риск от мандибулна остеонекроза и атипични фемурални фрактури и затова се препоръчват паузи в лечението след 3-5 години непрекъснато третиране с бисфосфонати (McClung, M., et al., 2013). Селективните ER-модулатори (Raloxifene) са агонисти / антагонисти с тъкан-селективни ефекти. В кости Raloxifene действа като селективен ER- β агонист, докато в млечна жлеза и ендометриум действа като селективен ER- α антагонист. Спектърът на терапевтично действие включва от една страна протекция на структурата и 35-43 % намаление на риска от фрактури на костта, и от друга страна понижаване на риска от инвазивен карцином на млечната жлеза (Mirkin, S., Pickar, J. H., 2015). Първия лекарствен продукт от група (iii), използван за биологична терапия на остеопороза е denosumab, който представлява анти-RANKL напълно хуманизирано моноклонално антитяло. Образуването на комплекс denosumab / RANKL прави невъзможно свързването на RANKL с RANK и по този начин се блокира активирането и функцията на остеокластите.

RANKL е протеин от суперфамилията тумор-некротиращ фактор, експресиран в Т- и В-лимфоцитни и дендритни клетки. Екстраполираните на тази основа теоретични предположения, че при терапията с denosumab има потенциален риск от опортюнистични инфекции не намериха потвърждение в реални клинични условия (Watts, N. B., et al., 2012). Клиничните данни показват, че при лечение с denosumab честотата на вертебралните и невертебрални фрактури на жени с постменопаузна остеопороза е намалена значително (Reginster, J. Y., et al., 2014). В последните години добра клинична перспектива за лечение на остеопороза имат новосъздадените лекарствени продукти от тази група blosozumab, romosuzumab и sclerostin (Lewiecki, E. M., 2014). Първият лекарствен продукт с анаболно действие приложен, който намира приложение за терапия на напреднала остеопороза е terapride, представляващ аналог на РТН. Клинични данни показват, че при силна остеопороза ежедневното интермитентно третиране с terapride има много добър анаболен ефект върху костния скелет (Silva, B. C., et al., 2011). Група V включва лекарства повлияващи Са-метаболизъм. Паратиреоиден хормон (РТН) предизвиква функционално противоположни и взаимно куплирани ефекти в костната тъкан. Продължителна хипер-РТН-емия провокира катаболни процеси на засилена костна резорбция и декалцификация на костната тъкан, докато интермитентна хипер-РТН-емия провокира анаболни процеси на засилена остеосинтеза и минерализация на костната тъкан (Friedman, P. A., 2011). Витамин D₃ (Vit. D₃) лекарствени продукти (Calcitriol) засилват Са-абсорбция / ретенция в костната тъкан действайки като агонисти на специфични нуклеарни рецептори в остеобластите. Адекватен Са-метаболизъм има важно значение за ефикасна профилактика и терапия на остеопороза.

Съгласно Директива на NOF (USA National Osteoporosis Foundation) на жените в менопауза препоръчва калций в доза 1.2 г / дневно и Vit. D₃ в доза 800-1000 IU / дневно (NOF Clinician's Guide, 2014). (vi) Индикации за

терапия с *комбинирани / последователно приложени* лекарства с различен механизъм на действие са силно изразена остеопороза със заплашващ риск от комплицирани фрактури и предшестваща терапия с бисфосфонати. Най-ефикасни при тази клинична симптоматика са терапевтични комбинации от бисфосфонат или анти-RANKL моноклонално антитяло и PTH аналог (Cosman, F., 2014). В клинични проучвания е установено, че комбинирана терапия с Alendronate, Risedronate или denosumab и terapride е по-ефикасна в сравнение с монотерапията при третиране на жени със силно изразена остеопороза (Black, D. M., 2003). Становището, че комбинираните терапевтични схеми помагат за индивидуализиране на лечението на жени с тежка пост-менопаузна остеопороза намира напоследък значителна подкрепа.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Целта на настоящия труд е 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 2 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 се избягва/отсрочват НЛР на бифосфонати и хормоно-заместителна терапия, или класически НСПВС.
2. Чрез повлияване системата на Азотно-окисната синтаза да се облекчават/модулират водещи НЛР към опиоиди – поведенчески прояви на зависимост/абстиненция, толерантност към кардиоваскуларните ефекти на морфин и имunosупресивния ефект на опиоидите.

ЗАДАЧИ

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

1. Да се разработи *Ex vivo/in vitro* експериментален модел на хормонално-обусловена „дисменорея“ и се верифицира „аналгетичния“ ефект на метамизол

- 1.1. Предизвикване на резки изменения в нивата на естрогени и гестагени като хормонален еквивалент на симплифициран дисменорея- подобен функционален модел.
- 1.2. След хормоналното третиране изолиране на гладкомускулен препарати от маотчен рог за изследване ефекта на метамизол върху амплитудата и честотата на миогенни и спонтанни контракции.
2. Да се разработи модел на постменопаузална остеопороза и да се проследи отсрочването и забавянето на скоростта на развитие на остеопороза от стандартизиран екстракт от *Artemisia* и фитоестрогена Генистеин.
 - 2.1. 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.
 - 2.2. Да се извърши имуно-хистохимично охарактеризиране на костните промени при развитие на остеопороза и повлияването от третирането със стандартизиран екстракт на *Artemisia* и фитоестрогена Генистеин.
 - 2.3. 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 *Artemisia* и фитоестрогена Генистеин.
 - 2.4. Да се проучат промените в болковия праг при остеопороза и повлияването от *Artemisia* и фитоестрогена Генистеин.
 - 2.5. Да се проследи модулирането аналгетичния ефект на метамизол от *Artemisia* и Генистеин при остеопоротична болка.
3. Да се проучи модулиращия ефект на NOS инхибиция върху развитието на ранен толеранс към някои сърдечно-съдови ефекти на морфин. Опиоиди са средство на избор за купиране остра висцерална болка при миокарден инфаркт.

4. Да се изследва модулацията от системата на азотния оксид върху промените в поведенчески и вегетативни прояви при опиоидна толерантност/абстиненция
5. Да се верифицират промените в нивата на NOS в стволни ядра на главния мозък, с доказано участие в реализацията на толерантност и зависимост/абстиненция към морфин.
6. Да се проучи модулацията на имunosупресивния ефект на опиоидите от системата L-Arg-NO.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1 Експериментални животни

Експериментите са проведени с женски и мъжки бели плъхове (Wistar), получени от вивариума на Медицински Университет София, съпоставени в контролирана лабораторна обстановка с естествен ден/нощ циркадиален ритъм и 22° С при свободен достъп до вода и гранулирана храна. При мъжките т.м. е била от 240 до 250 g, а при женските от 180 до 185 g. След завършване на *in vivo* експериментите животните са екстерминирани със свръхдоза CO₂ газ, въздушна емболия или екссангвинация под обща анестезия. За фармакологични, имунологични, хистохимични, хистологични и денситометрични изследвания са изолирани слезка, тимус, утерус, главен мозък, десни фемур, тибиа и 2 мл кръв. Използваните субстанции са от Sigma-Aldrich и са прилагани в обем 1 ml / kg или 3 ml / kg (L-Arginine) 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.

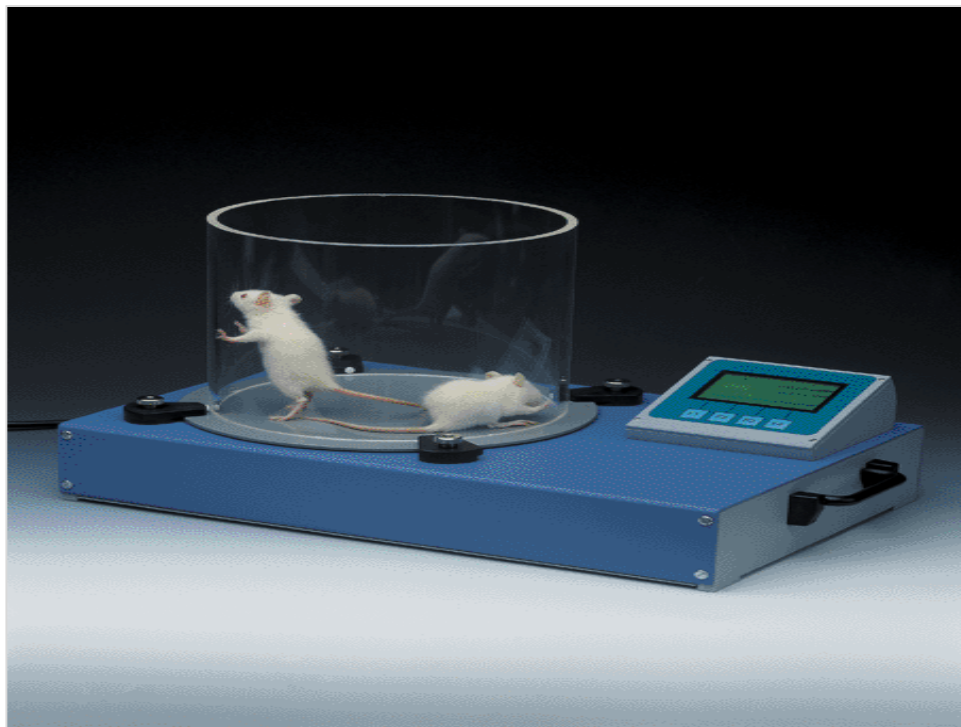
2. „Поведенски“ модел на експериментална опиоидна толерантност / зависимост

Изследванията са проведени върху мъжки плъхове (240 - 250 g). Животните са разделени в групи (G) *at random* по 8 - 10/група и отглеждани без ограничение на двигателната активност в контролирана лабораторна обстановка. Изследвани са аналгетичен ефект и ED₅₀ на морфин при еднократно инжектиране на morphine hydrochloride (Морфин, 5 mg/kg, *s.c.*) или Морфин (5 mg/kg, *s. c.*) и N^G-Nitro-L-Arginine methyl ester (L-NAME, 15 mg/kg, *i. p.*). В друга серия експерименти опиоидната толерантност, зависимост и абстиненция са изследвани в групи като следва: (G1) Морфин

инжектиран ежедневно в 9:00 h и 17:00 h в продължение на 11 дни в обща дневна доза 5 mg / kg,*s.c.*, увеличавана през 48 h с от 5 mg/ kg до 30 mg/kg, *s. c.*, (G2) L-NAME инжектиран ежедневно в 8:30 h в продължение на 11 дни в дневна доза 5 mg/kg,*i. p.*, (G3) морфин инжектиран както в G1 и L-NAME инжектиран както G2, (G4) Физиологичен разтвор (PS) инжектиран в доза 1.0ml/kg както в G1, (G5) морфин инжектиран както в G1 и Налоксон инжектиран еднократно в 10:00 h на ден 11 в доза 5 mg/kg,*i. p.*, (G6) морфин и L-NAME инжектирани както в G3 и Налоксон инжектиран като в G5, (G7) Морфин инжектиран еднократно в 9:00 h на ден 11 в доза 20 mg/kg, *s. c.*, (G8) Налоксон инжектиран както в G5. Ноцицептивните прагове са определяни с radiant heat tail-flick test (D' Amour & Smith, 1941), показан на фиг.2.1. Латентното време на ефекта на еталониран топлинен стимул (tail withdrawal reflex) фокусиран върху проксималната третина на опашката е измерено с tail-flickanalgesimeter (Ugo Basile, Italy) при cut-off time 20 s.



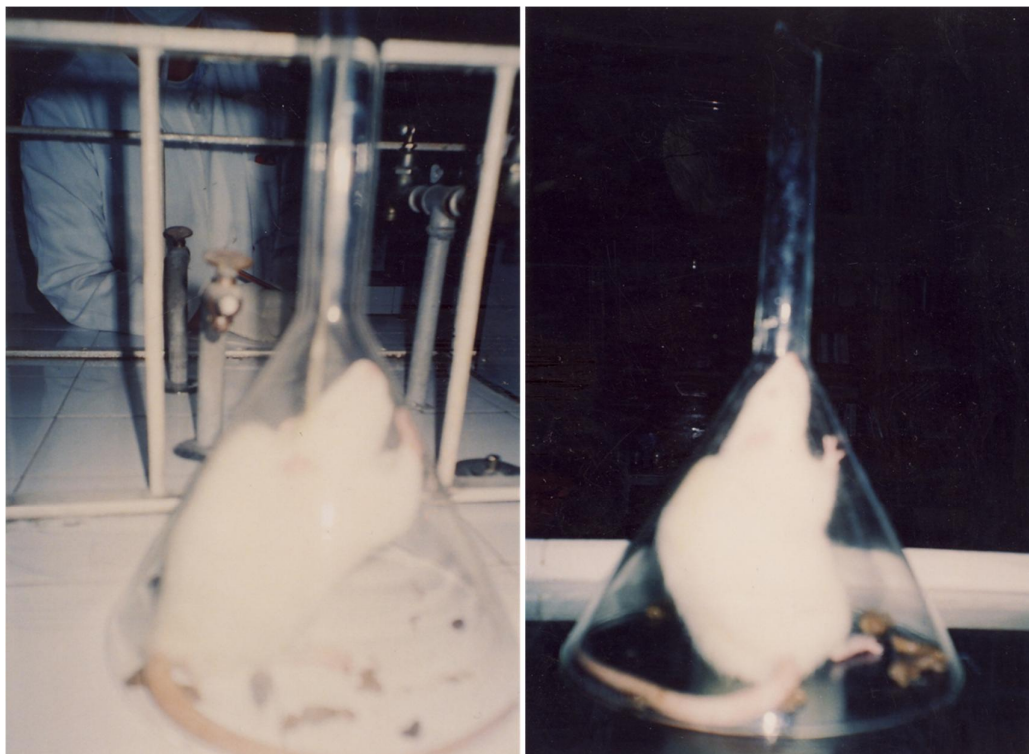
Фиг. 2.1 Radiant heat tail-flick test. Терминалният лъч е фокусиран върху дисталния край на опашката, като времето, за което животното се отдръпва се отчита с таймер



Фиг. 2.2 Hot Plate Test. При този тест се отчита времето, за което животното близва задната си лапа

За количествена оценка на симптомите на толерантност, зависимост и абстиненция е разработена и приложена оригинална новосъздадена кумулативна дигитална скала (Таблица 1), при което са взети предвид някои позитивни аспекти на скали използвани в предишни изследвания (Herman et al., 1995, Bhargava & Thorat, 1996). Тежестта на симптомите на опиоидна толерантност, зависимост и абстиненция е оценявана от двама квалифицирани специалисти, които нямат информация за схемите на третиране, респ. групата на наблюдаваните от тях животни. В три последователни периоди от 10 мин всяко животно се поставя под стъклена фуния с диаметър 50 см, където може да се движи свободно и поведението му да се наблюдава непрекъснато, фиг.8.3.. Квантифицира се тежестта на симптомите през втория 10 мин период, кумулативната тежест през целия период на наблюдение и средната тежест за дадена група. Стойностите за тежестта на симптомите са лимитирани допустимо в адекватни граници. Всички наблюдения са проведени в интервала 11:00 - 13:00 h. След

приключване на експериментите от тази серия *at random* се подбират по 3 животни от групи G1 - G4 за *in vitro* изследвания на лимфоцитна пролиферация и тимоцитна апоптоза / ДНК фрагментация и от групи G1 - G8 за *in vitro* хистохимична визуализация на NO-синтаза.



Фиг.2.3. Оценка на тежестта на симптомите на опиоидна зависимост, толерантност и абстиненция

Таблица 1. Скала за оценка на опиоидна толерантност, зависимост / абстиненция

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 „восъчна фигура“	1 за всеки мин. 60 s нон-стоп	10
16) Прострация	1 за всеки мин. 30 s нон-стоп	10

3. „Кардиоваскуларен“ модел на експериментална опиоидна толерантност / зависимост

Изследванията са проведени върху мъжки плъхове (260 - 280 g). При обща анестезия (Pentobarbital, 14 mg / kg, *i. p.*, Ketamine, 25 mg / kg, *i. p.*) в дисталната част на абдоминалната аорта и дясната илиачна вена е поставен катетър (PE, Portex) през десните феморални съдове за *on line*-мониторинг на артериалното кръвно налягане (BP) и пулсова честота (HR), респ. за инжектиране на изследваните субстанции. Пост-оперативно е приложен еднократно Gentamicin (8 mg / kg, *i. m.*). Животните са разпределени *at random* в групи (D, 5 - 6/ група) и третирани както следва: (D1) Морфин, инжектиран 24 h и 72 h след катетеризацията 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 проследено на обездвижени животни (Ballman type KN 326 restrainer, Natsume) в продължение на 120 мин. Артериалното кръвно налягане и пулсова честота са регистрирани с трансдюсер P23ID (Statham), свързан с мониторна система MP100 WSW (Biopack Systems). Данните са получени с AcqKnowledge III 3.2 software (Biopack Systems) за обработване на биологични сигнали. Резултатите са представени като % изменения (+/-) на систолно (SBP), диастолно (DBP), средно (MBP) артериално кръвно налягане и пулсова честота.

4. Concanavalin A-индуцирана лимфоцитна пролиферация при експериментална опиоидна толерантност / зависимост

Екстирпираните слезки на животни от групи G1-G4 са фрагментирани и прекарани през стоманено сито. Получената клетъчната суспензия е промита със стерилен фосфатен буфер (PB) и центрофугирана в продължение на 10 мин на 1000 g при 23° C. Утаените клетки са суспендирани в 20 ml PB, разпределени в 5 ml histopaque епруветки и центрофугирани в продължение на 30 мин на 400 g при 23° C. Белите кръвни клетки в интерфейса са събирани, измити двукратно с PB и ресуспендирани в стерилен RPMI медиум, съдържащ 10 % Fetal calf serum и Penicillin / Streptomycin (100 U / ml) до крайна концентрация 2×10^6 клетки / ml. За избягване развитието на “*in vitro withdrawal*” (Vlaskovska et al.,1997) съответно на третирането *in vivo*, медиума съдържа Морфин (1 μ M) или / и L-NAME (5 μ M). Аликвот (100 μ l) от клетъчните суспензии, получени от животни третирани с Морфин, L-NAME, Морфин и L-NAME или PS са пипетирани в трипликат в flat-bottom cell culture plates, в които има Concanavalin A в концентрация 125 μ g / ml или 500 μ g / ml. Клетъчните култури са инкубирани в продължение на 48 h в атмосфера от 5 % CO₂ в O₂ при 37° C. Във всеки аликвот 20 h преди събиране на клетките (Cell Harvester, Flow Laboratories) върху специални блот-диск (Watmann) е

прибавен ^3H -Thymidine (1 μC / well). Индивидуалните блот-дискове са разтворени в сцинтилационен разтвор и ^3H -радиоактивността в пробите е определена (Beta Rack, LKB) като разпади / мин (DPM). Индекс на пролиферация (PI) е изчислен като отношение DPM тест / DPM контрол.

5. Апоптоза/ДНК фрагментация на тимоцити при експериментална опиоидна толерантност/зависимост

Ексцизирани тимусни жлези на плъхове от групи G1- G4 са освободени от съединителна тъкан и фрагментирани. Фрагментите са фиксирани в 2.5 % glutaraldehyde в 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) за 1 h при 4° C, повторно фиксирани в 1 % OsO₄ за 2 ч, след което са нарязани на полутънки срезове (100 μm), оцветени с 1 % toluidine blue за светлинна микроскопия (LM) или ултратънки срезове (50 μm), оцветени с 1 % uranyl acetate и lead acetate за електронна микроскопия (EM). Тимоцитната суспензия е ресуспендирана в 5 ml буфер, съдържащ 75 mM NaCl и 25 mM Na EDTA (pH 8.0) за 30 мин, след което е инкубирана в присъствие на Protease K (100 mg / ml) при 35° C в продължение на 6 ч. DNA във вискозен разтвор е екстрахирана двукратно с Phenol и еднократно с 50 % 2-propanol в продължение на 3 h при 20° C. Екстрактът е обработен с RNAase (50 mg /ml) в продължение на 2 h при 37° C. LM, EM, indirect Annexin V immunofluorescence (IIF), TUNEL и indirect immunoperoxidase оцветяване са прилагани, както е описано по-рано (Marinova, Ts., 2005). Agarose gel електрофореза на фрагментирана DNA в 1 % agarose gel в 90 mM TRIS borate (pH 8.0) оцветена с ethidium bromide (1 mg /ml) е визуализирана в ултравиолетова светлина по метод описан по-рано (Marinona et al., 2000). Използвани са Annexin V-FL (Santa Cruz Biotechnology), Annexin V-FITC (Boehringer) и TUNEL in situ cell death detection kit (Boehringer). Визуализацията е извършена със светлинен микроскоп Axioscop 20 (Zeiss Opton) и електронен микроскоп Hitachi H500 (Hitachi).

6. Експресия на невронална NADPH diaphorase (NO-синтаза) при експериментална опиоидна толерантност / зависимост

При обща анестезия с етер плъхове от групи G1- G8 са ексангвинирани през дясната югуларна вена с транскардиална перфузия на 0.05 М фосфатен буфер (PB) в продължение на 5 мин, след което в продължение на 20 мин животните са фиксирани с транскардиална перфузия на 4 % paraformaldehyde и 0.15 % picric acid в 0.1 М PB. Главният мозък на всяко животно е отделен и поставен в същия фиксатор за 24 ч. След това мозъците се оставят за една нощ в 20 % разтвор на захароза в 0.1 М PB, след което се нарязват на серийни коронални срези (30 μ m) на замразяващ микротом (Reichert Young). Хистохимичното определяне на NADPH diaphorasee направено с модифицирана процедура на Scherer-Singler (Scherer-Singler et al.,1983). Free floating тъкълни срези, включващи periaqueductal gray matter (PAG), dorsal raphe nucleus (DRN), pedunculopontine tegmental nucleus (PPN), laterodorsal tegmental nucleus (LTD) се измиват с 0.8 % Triton X-100 (Fluka) Tris / HCl (pH 7.4) за 30 мин, след което са инкубирани в 10 mM Tris / HCl буфер, съдържащ 4.0 mg NADPH (Sigma) и 10 mg nitroblue tetrazolium (Fluka) за 2 h при 37° C. Срезите се измиват с PB, монтират на покрити с chrome-gelatin предметни стъкла, изсушават се на въздух в продължение на 24 ч, след което се дехидрират и включват в Etalan (Merck). Светлинната микроскопия е извършена с фотомикроскоп Jenaval (Jena Zeiss). 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. Диафоза-позитивни клетки не са открити в срези, които са инкубирани в медиум без NADPH.

7. „*In vitro* еквивалент“ на спастична висцерална болка при симплифициран хормонално симулиран дисменорея-подобен функционален модел *in vivo*

Изследванията са проведени върху 24 женски плъха (180-185 g). На всички животни е направена трансабдоминална билатерална овариектомия при обща (pentobarbital 20 mg/kg, *i. p.* и ketamine 25 mg/kg, *i. p.*) и локална *intra-operationem* (Lidocaine 1 %, 0.4 ml/плъх) анестезия. След еднократна доза gentamicin (8 mg/kg, *i. m.*) животните се възстановяват в продължение на 14 дни, след което в 5 последователни дни всяко животно е третирано 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 (Th2-4) се имплантират осмотични помпи, т. н. matrix driven delivery system (MDDS) 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 (8 животни). При краткотрайна обща анестезия (ketamine 50 mg/kg, *i. p.*) MDDS са експлантирани след 9 дни (гестаген-MDDS) и след 12 дни (плацебо-MDDS). Предизвиканите резки изменения в нивата на естрогени и гестагени са хормонален еквивалент на симплифициран дисменорея-подобен функционален модел. Животните са екстерминирани 18 дни след старта на хормоналното третиране и от средната част на маточните рога на всяко животно се ексцизира цилиндричен сегмент с *in situ* дължина 20 мм. Получените гладкомускулни препарати се фиксират хоризонтално между два платинови ринг-електроди с диаметър 4 мм, монтирани в термостатизирана (37° C) камера (1.0 ml) на разстояние 10 mm и 26 mm от изходния отвор. Препаратите са суперфузирани (1.3 ml/min) чрез перисталтична помпа (Watson-Marlow) с хранителен разтвор съдържащ (mM/l) NaCl 136.9, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 0.6, NaHCO₃ 11.9, KH₂PO₄ 0.5, glucose 11.5, суплементиран с (mg/l) EDTA 10, albumin (BSA) 25, аериран с

5 % CO₂ в O₂ (pH 7.3 - 7.5). Разположеният към входа на камерата край на препаратата е фиксиран неподвижно като противоположния край на препаратата е закрепен към изометричен механопреобразовател (Grass FT 03C). Препаратът е разтегнат (0.5 - 0.8 mN) до приблизителна *in situ* дължина и е оставен да адаптира в продължение на 60 мин. Контрактилната активност на миометриума се активира с 20 мин суперфузия на хранителен разтвор, съдържащ PGF₂ α (Prostin, 50 nM/l). Прилагана е миотропна електрическа стимулация (MFS-1) с правоъгълни импулси (50V, 10Hz, 6ms, 5s) през 120 s интервали. В продължение на 120-150 мин. са регистрирани спонтанни и евокирани контракции. Анализирани са средните амплитуда (mN) и честота (контракции / 10 мин) 10 мин епизоди преди и по време на PGF₂ α суперфузия. За минимизиране на неизбежните вариации данните се стандартизират като всеки отговор се представя като отношение на средна стойност post / pre PGF₂ α .

8. Модел на експериментална остеопороза

Изследванията са проведени върху 48 женски плъха (180-185 g), отглеждани без ограничаване на двигателната активност. След 7 дни на адаптация при обща (pentobarbital 12 mg/ kg, *i. p.*, ketamine 50 mg/ kg, *i. p.*) и локална *intra-operationem* (lidocaine 1 %, 0.4 ml / плъх) анестезия на всички животни е направена дистална лапаротомия (2-2.5 см). При 36 от тях, избрани *at randome* извършена билатерална овариектомия. Постоперативно на всички животни е приложен еднократно gentamicin (8 mg / kg, *i. m.*). Три месеца след оперативната интервенция животните са разпределени в групи (A) по 12 / група и третирани както следва: (A1) неовариектомирани-нетретирани, (A2) овариектомирани-нетретирани, (A3) овариектомирани-третирани с Genistein (10 mg / ml, в стерилно растително масло), (A4) овариектомирани-третирани секстракт 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.*

9. Фитохимични методи за изолиране, пречистване и верификация на екстракт от *Artemisia nodiflorum* (Методите са приложени в изследвания проведени в ИОХЦФ - БАН)

(i) *Екстрахиране.* Пресни корени от Българска целина (*Artemisia nodiflorum*) са екстрахирани в метанол в продължение на 24 h при 18° C. Получените екстракти са филтрирани, събрани и цялото количество изпарено във вакуум до сух остатък.

(ii) *Фитохимичен анализ.* Стандартизацията на екстракта от *Artemisia* е извършена чрез количествено определяне на тоталното съдържание на феноли и флавоноиди в сухия остатък, разтворен 0.9 % NaCl (10 mg/ml). Флавоноидите са квантифицирани по стандартна крива получена от 0.009, 0.019, 0.037, 0.075 и 0.19 mg/ml Quercetin при абсорбция 425 nm. Фенолите са квантифицирани по стандартна крива получена от 0.009, 0.019, 0.037, 0.075 и 0.19 mg/ml Gallic acid при абсорбция 760 nm. Анализът е извършен в трипликат за всяка концентрация.

10. Остеоденситометрични методи за изследване и диагностика на остеопороза (Методите са приложени в изследвания, проведени в МБАЛ „Александровска“).

Изследвани са всички оперирани животни преди и 6 месеца след оперативната интервенция, както и след завършване на фармакологичното третиране.

Bone mineral density и *bone mineral content.* Стойностите са измерени в дясната фемурална и тибиялна кости. Приложен е метод на dual energy X-ray absorptiometry. Изследванията са извършени с densitometer (DEXA hologic discovery A, v. 13. 2. 3), снабден със софтуер за изследване на малки

животни (Small animal, WB rat). По време на измерването животните са с обща анестезия (pentobarbital, 50 mg / kg, *i. p.*).

11. ELISA методи за определяне на IL-6 и RANKL (NF-κB) в серум.

Използвани са комерсиални кит ELISA (Abcam) за определяне на IL-6 и NF-κB в серум. Нивата на изследваните фактори са определяни в дубликати от всяка проба серум с microplate reader при екстинкция 450 nm.

12. Методи за изследване на ноцицепция

(i) *Plantar heat test*. Ноцицептивният праг се определя с латентното време (s) на защитна реакция (флексия) спрямо калибриран термален стимул фокусиран върху плантарната повърхност на задната лапа, фиг.12.1. Изследванията са проведени с dynamic aesthesiometer (Ugo Basile) при cut off time 20 s



Фиг.4.12. 1. *Plantar heat test*. Когато животното почувства болка, отдръпва лапата си, датчикът спира да възприема отразената светлина и апаратът регистрира латентното време в секунди

(ii) *Hind paw pressure test*. Ноцицептивния праг е определяне големината на натиска (g / cm^2) приложен към дорзалната повърхност на задната лапа, при която настъпва защитна реакция (флексия). Изследванията са проведени с analgesimeter (Ugo Basile).



Фиг.12. 2. *Hind paw pressure test*. Прилага се натиск към дорзалната повърхност на задната лапа, при който настъпва защитна реакция (флексия). Големината на натиска се отчита с g / cm^2 .

(iii) *Carrageenan-induced edema*. Инфламаторните болка и оток се определят като ноцицептивен праг и плетизмометрично измерен обем на отока предизвикани от инжектиран субплантарно в задната лапа 0.1 ml разтвор на Carrageenan във физиологичен разтвор (10 mg /ml). Изследванията са проведени в Plantar heat test посредством dynamic aesthesiometer, Hind paw pressure test посредством analgesimeter и плетизмометрия на задната лапа посредством plethysmometer (Ugo Basile), фиг.12.3.



Фиг.12. 3. Plethysmometer (Ugo Basile). Плетизмографията отчита обемът на лапата (в ml) на базата на възместимостта

13. Методи за хистоморфологично и хистометрично изследване на кости. (Методите приложени за изследвания са изпълнени в Катедрата по Анатомия, хистология и ембриология на МУ София)

Десните фемурална и тибиялна кости на животни от групи А1-А4 са фиксирани в 10 % формалин в продължение на 24 h. Меките тъкани са отстранени и костите са декарцифицирани в 8 % hydrochloric acid и 10 % formic acid във фосфатен буфер в продължение на 24 h при 37° С. Дисталната цилиндрична част на всяка кост е отделена и фрагмент с дължина 1.5 см от проксималния остатък е дехидратиран в етанол (95 %) в продължение на 24

h, след което е включен в парафиново блокче. Фронтални срези (8 μm) са монтирани на предметни стъкла и оцветени с хематоксилин - еозин. Хистомикроскопски образ на проксимални епифиза и метафиза на фемурална и тибиялна кост от всяко животно, получени със светлинен микроскоп Nikon Eclipse 80i (Nikon) са дигитализирани с дигитална камера DXM 1200C, комплектована със софтуер NIS elements AR 2.30. Хистологичните анализи са извършени от експерт, който няма информация за фармакологичното третиране на всяко животно. В едно и също поле са измерени директно костна трабекуларна област (mm^2) като част от тоталната тъканна трабекуларна област (костен мозък и кост) и периметър на костен мозък / кост интерфейс (mm). За всяко животно са измерени минимално 8 mm^2 тъканна област и 30 mm периметър, които са минимално необходими при хистоморфометрични измервания на тъканна област и периметър (Recker et al., 2011). Верифицирането на трабекуларна и кортикална област се основава на по-рано дефинирани критерии (Duncan, H., 1976, Parfitt et al., 1983). В морфометричния анализ не са включени спонгиозна и ново-образувана кост (Lee & Yao, 2001, Lelovas et al., 2008). 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).

14. 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 $P \leq 0.05$.

V. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РЕЗУЛТАТИ

1. „*In vitro* еквивалент“ на спастична висцерална болка при симплифициран хормонално симулиран дисменорея - подобен функционален модел: Ефект на PG F2 α и аналгин (metamizol)

1.1. Евокирани миогенни контракции

Резултатите показват, че PG F2 α 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. 1. 1. 1).

Таблица 1.1.1. Ефект на аналгин върху амплитудата и честотата на миогенни и спонтанни контракции (отношение post- / pre - PG F2 α) 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 ^{a,c} (n 16)	3.310 \pm 0.984 ^a (n 5)	1.675 \pm 0.075 ^{b,d} (n 16)

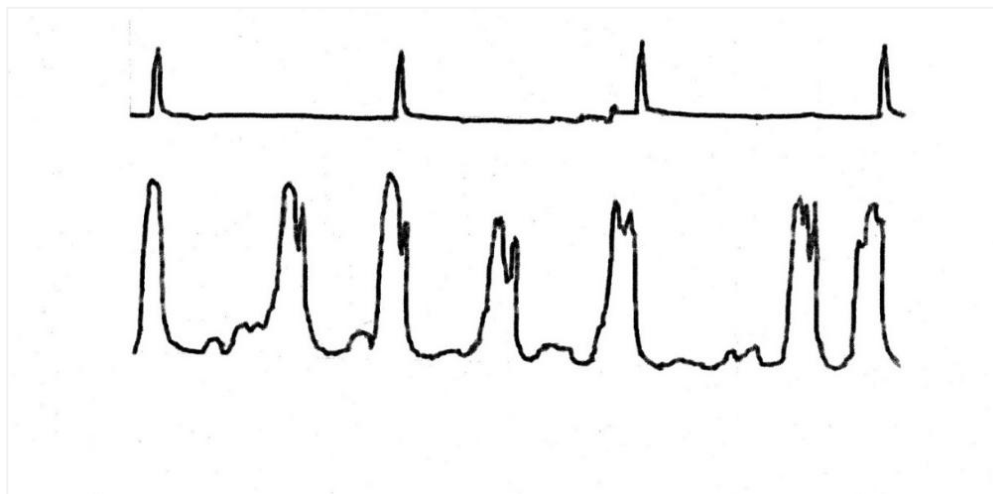
(a) $P \leq 0.001$ и (b) $P \leq 0.05$ vs „дисменорея“, (c) $P \leq 0.001$ и (d) $P \leq 0.05$ vs плацебо, (n) брой изследвани препарати от съответната група

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 μ M аналгин. Данните показват, че при тази схема на фармакологично третиране PG F2 α увеличава амплитудата на евокираните контракции над 2.5 пъти (Табл. 1. 1. 1).

1.2. Спонтанни контракции

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 ± 0.87 и на препаратите изолирани от група „дисменорея“ е 5.75 ± 0.85 . Резултатите показват, че PG F2 α засилва умерено спонтанната съкратителна активност и слабо тонуса на препаратите изолирани от група плацебо. PG F2 α потенцира много силно спонтанните контракции и умерено повишава тонуса на препаратите изолирани от група „дисменорея“ (Табл. 1. 1. 1).

Трасетата на Фиг. 1. 2. 1 и Фиг. 1. 2. 2. са оригинални механограми на препарат от група плацебо и препарат от група „дисменорея“, които са представителни за всички препарати изолирани от двете групи животни.

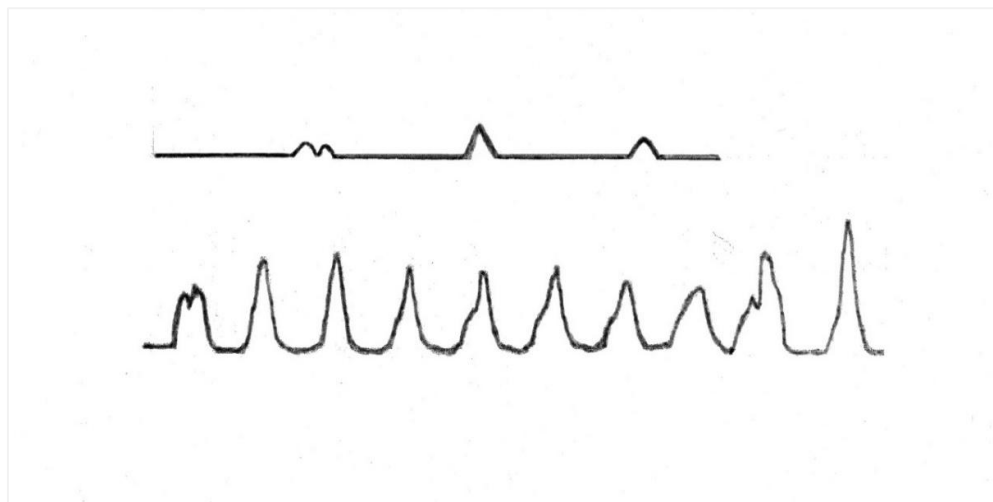


Фигура 1. 2. 1. Електрически евокирани миогенни контракции на „плацебо“ миометриум в отсъствие (горно трасе) и присъствие (долно трасе) на PGF2 α

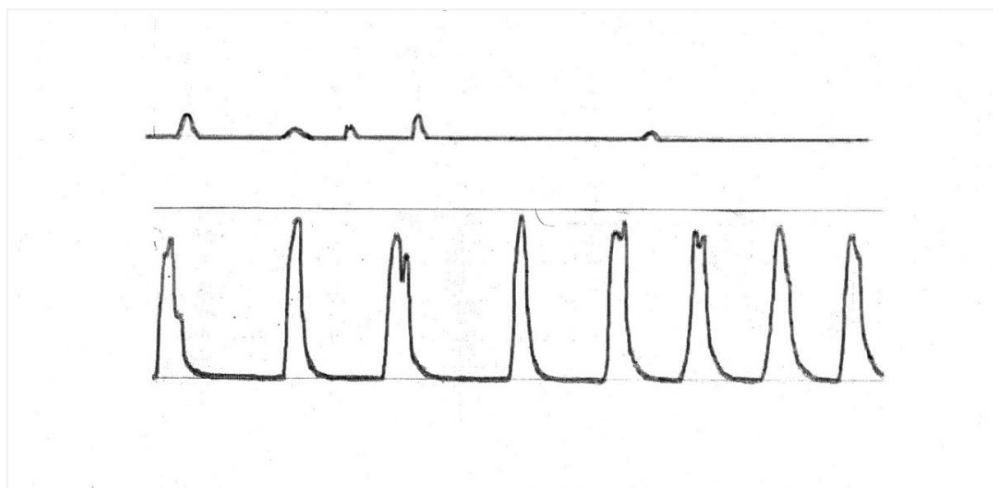
Контракции 2, 4 и 6 в долното трасе са спонтанни. Съкратителна активност на препарат изолиран от плъх № 6 от група плацебо.

Механограмите са представителни за всички препарати изолирани от тази група животни.

Група Контрол (плъх 2). Спонтанни контракции при липса (горно трасе) и наличие (долно трасе) на PGF_{2α}.



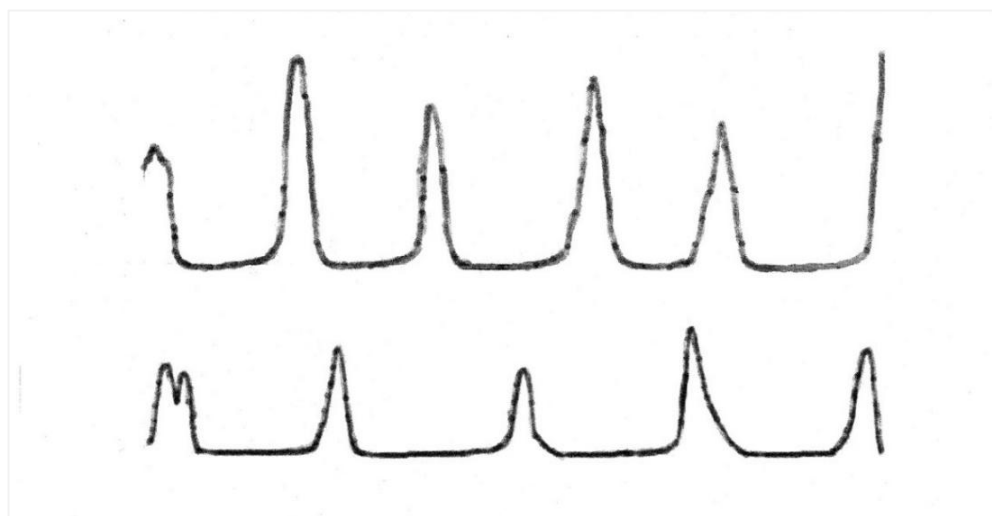
Фигура 1. 2. 2. Електрически евокирани миогенни контракции на „дисменорея“ миометриум в отсъствие (горно трасе) и присъствие (долно трасе) на PG F_{2α}



Контракции 2 и 3 в горното трасе и контракции 1, 3, 5, 8 в долното трасе са спонтанни. Съкратителна активност на препарат изолиран от плъх № 7 от група „дисменорея“.

Горното трасе е запис регистриран с 2.5 пъти по-голямо усилване на сигнала. Механограмите са представителни за всички препарати изолирани от тази група животни.

Ефектът на аналгин върху спонтанните съкращения и тонуса и евокираните контракции е проследен в 10 мин епизоди от суперфузията на препаратите от група „дисменорея“ в продължение на 30 мин с хранителен разтвор съдържащ на 500 μ M аналгин. Данните показват, че при тази схема на третиране PG F2 α има много по-слаб ефект върху амплитудата на спонтанните съкращения и няма ефект върху тонуса препаратите от тази група (Табл. 1. 1. 1). Механограмите представени на Фиг. 1. 2. 3. са представителни за отговорите на всички препарати изолирани от тази група животни.



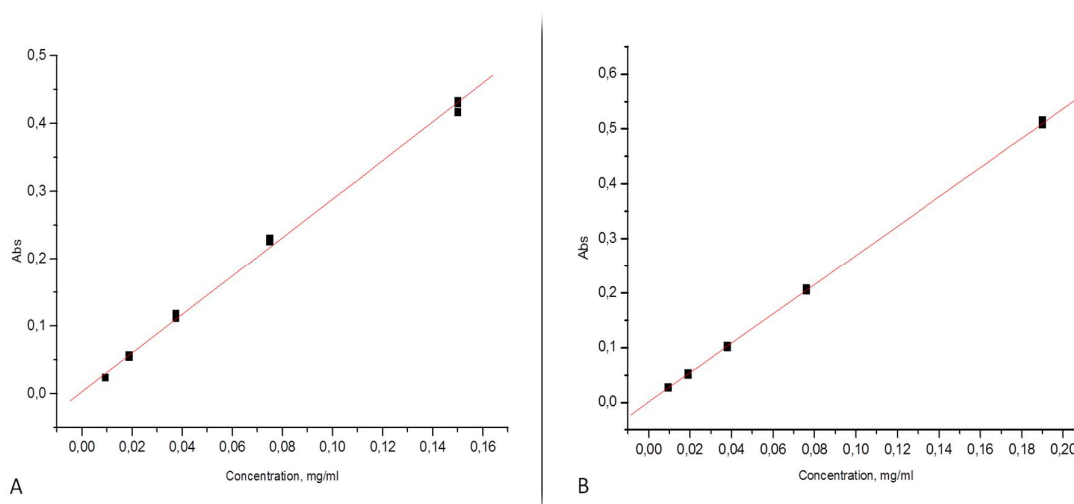
Фигура 1. 2. 3. Ефект на аналгин върху електрически евокирани миогенни контракции на „дисменорея“ миометриум в отсъствие (горно трасе) и присъствие (долно трасе) на PG F2 α

Съкратителната активност на препарат изолиран от плъх № 5 от група „дисменорея“.

Механограмите са представителни за всички препарати изолирани от тази група животни.

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

Чрез фитохимичен анализ е установено, че тоталното фенолно съдържание в метаноловия екстракт е 890 ± 11 mg/100 g GAE (Galic acid equivalent) и 234 ± 6 mg/100 g QE (Quercetin equivalent). Фигура 2. 1. представя стандартните криви за Galic acid и Quercetin.



Фигура 2. 1. Стандартни криви (концентрация /бсорбция) за Galic acid (A) и Quercetin (B)

2. 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. 2. 1. 1.

Телесната маса е измерена отново в края на втория месец от третирането с Genistein или екстракт на *Arrium*. Данните показват, че разликите между средните стойности на телесната маса на изследваните 4 групи животни (овариектомирани, шам-оперирани, третирани с Genistein и третирани с екстракт на *Arrium*) са статистически недостоверни.

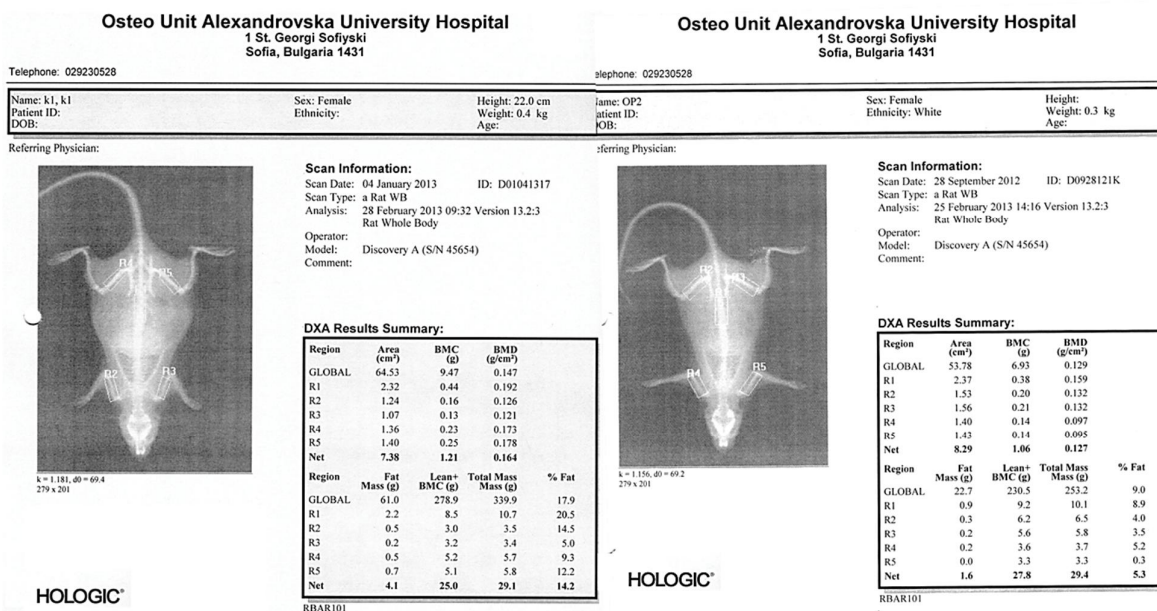
Таблица 2. 1. 1. Средна телесна маса (g)

Група, интервенция	Телесна маса <i>ante-operationem</i>	Телесна маса <i>post-operationem</i>
Контрол (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

2. 2 Динамични промени на костната минерална плътност (BMD)

Дензитометрично изследване бе проведено, както на контролни, така и на овариектомизирани плъхове (остеопороза) и третирани с *Arrium* 8 месеца след овариектомията. Данните са илюстрирани на фиг. 2. 2. 1.a

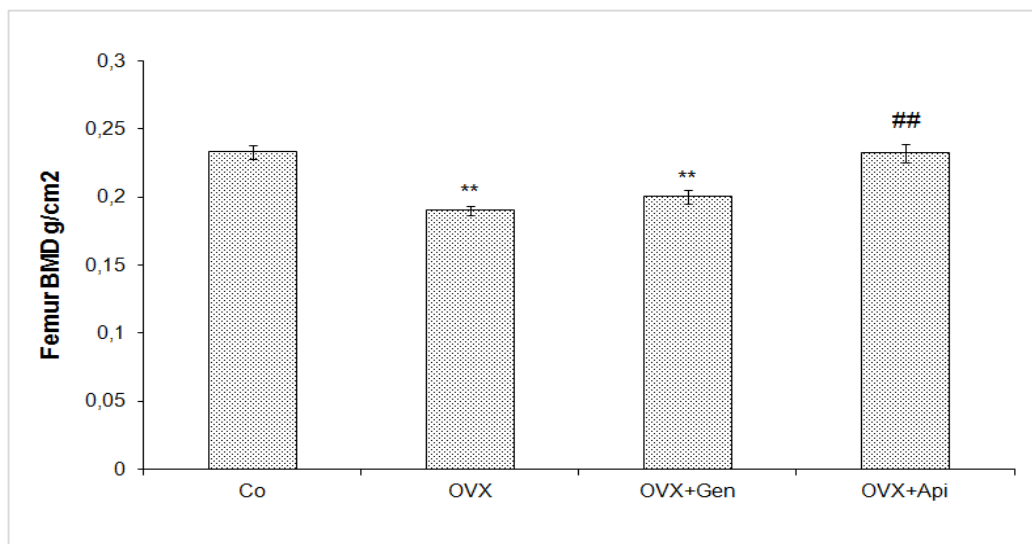


Фигура 2. 2. 1. . Дензитометрично изследване на контролни и овариектомизирани плъхове

Повторното измерване на BMD е направено 8 месеца след хирургичните интервенции. Данните показват, че костната минерална плътност на фемуралната кост на всички овариектомирани 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) 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. 2. 2. 1.



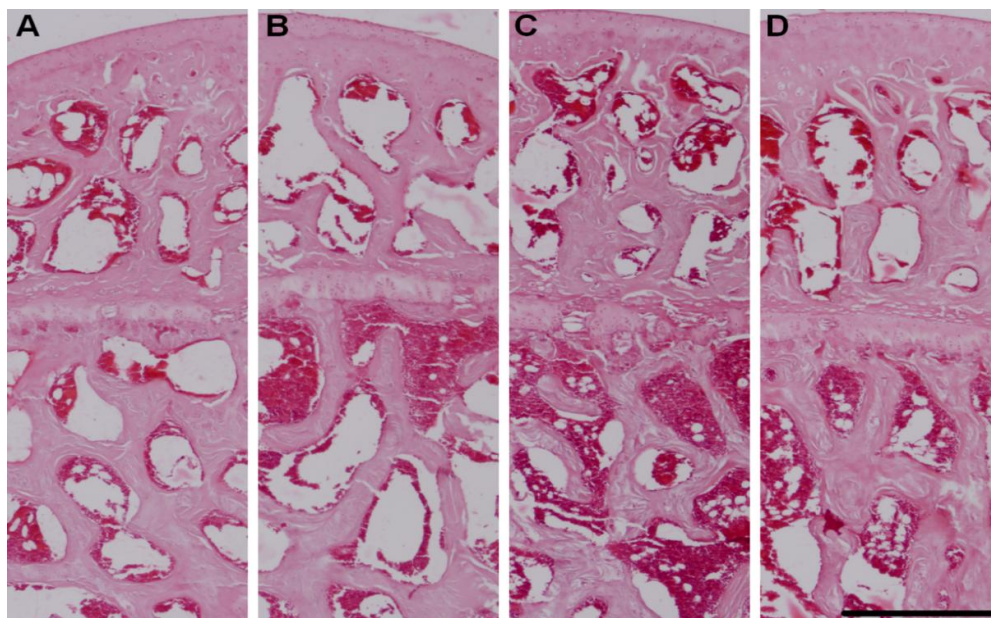
Co контрол sham оперирани, OVX контрол овариектомирани, OVX Gen овариектомирани третиращи с Genistein, OVX Api овариектомирани третиращи с екстракт на *Apium*

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

Фигура 2. 2. 1. Костна минерална плътност (BMD) на фемурална кост

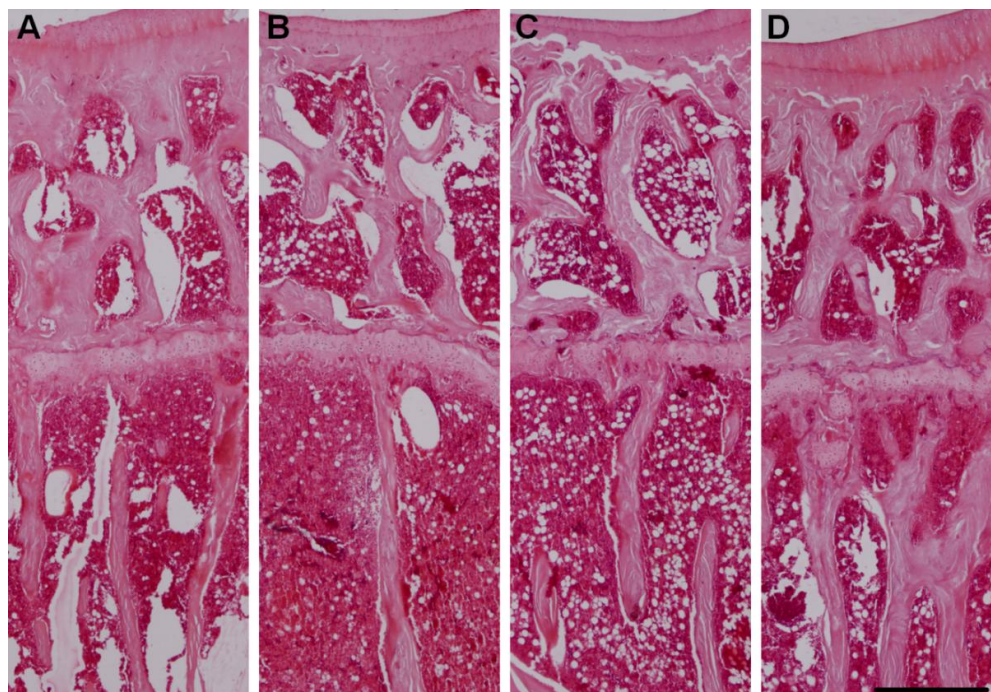
2.3 Динамични промени на костната микроархитектура

Хистологичната структура на проксималната част на фемуралната и тибиялна кост са представени на Фиг. 2. 3. 1. и Фиг. 2. 3. 2. Костите на животните от група контрол показват нормална, непроменена структура. Епифизният хрущял представлява хоризонтална ламина, която ясно разделя епифизата (отгоре) от метафизата (отдолу). Трабекулите формират сложна мрежа и само малък брой трабекули остават свободни в краищата. Костномозъчните пространства между трабекулите са сравнително малки (Фиг. 2. 3. 1А и Фиг. 2. 3. 2А). 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. 2. 3. 1В и Фиг. 2. 3. 2В). Фемуралната и тибиялната кост на третираните с Genistein плъхове имат значително по-добра костна архитектура на (Фиг. 2. 3. 1С и Фиг. 2. 3. 2С). Още по-силен благоприятен ефект върху костната структура има третирането на животните с екстракт на *Arium* (Фиг. 2. 3. 1D и Фиг. 2. 3. 2D), от което нормалната костна структура е възстановена почти напълно. Детайлните данни за ефекта на екстракт на *Arium* 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. 2. 3. 3 и Фиг. 2. 3. 4. Данните показват, че 9 месеца след овариектомията обема на костните трабекули в проксимална епифиза е намален съществено, като този ефект е по-силно проявен в тибиялната кост.



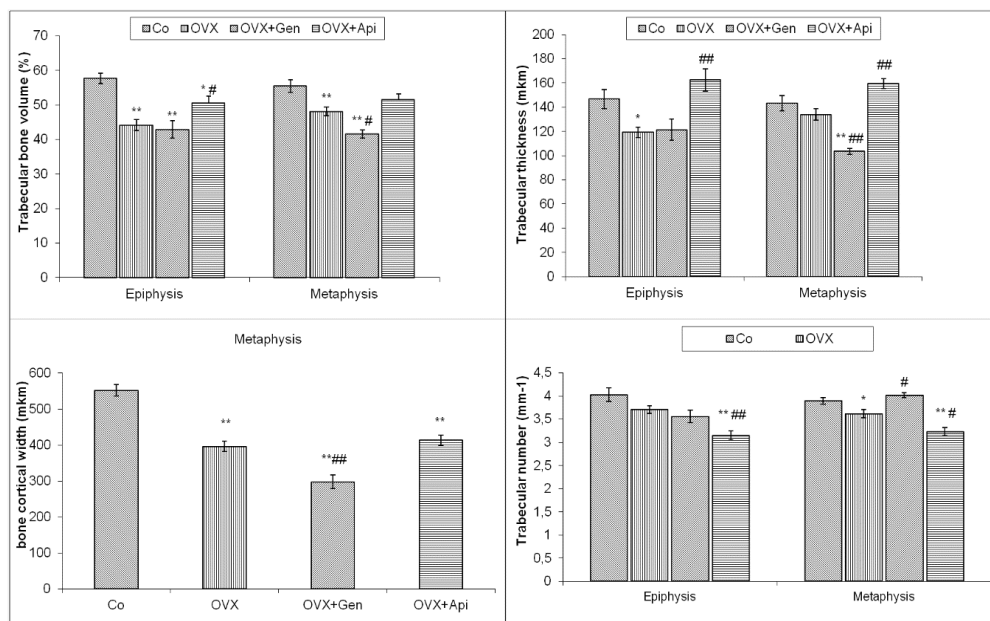
А контрол шам оперирани, В контрол овариектомирани, С третирани с Genistein, D третирани с екстракт на Apium. Скала на маркировката 500 μ m

Фигура 2. 3. 1. Представителни микрофотографии на фронтални лонгитудинални срези от проксимална част на фемурална кост



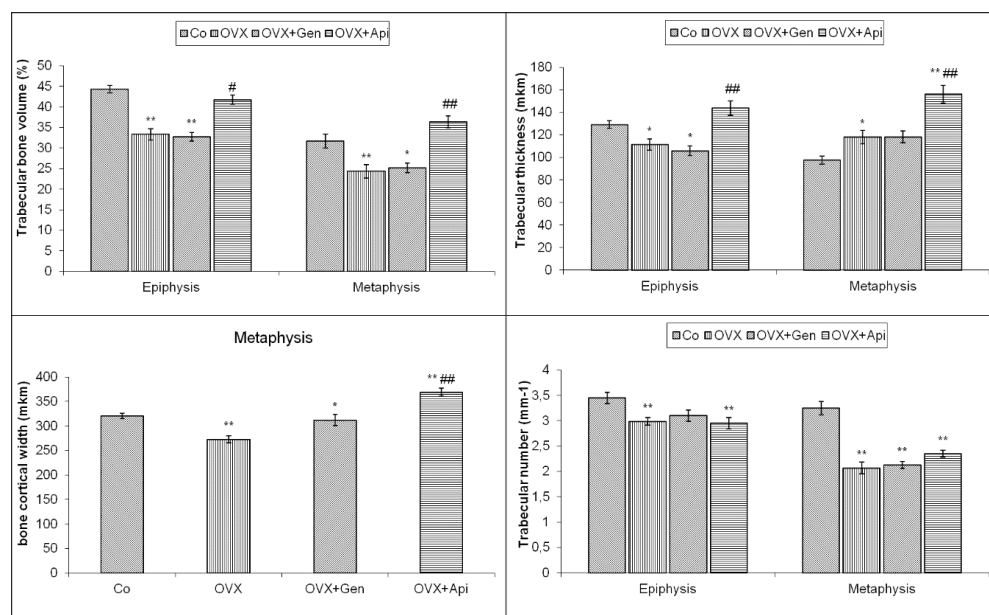
А контрол шам оперирани, В контрол овариектомирани, С третирани с Genistein, D третирани с екстракт на Apium. Скала на маркировката 500 μ m

Фигура 2. 3. 2. Представителни микрофотографии на фронтални лонгитудинални срези от проксимална част на тибиялна кост



Co контрол шам оперирани, OVX контрол овариектомирани, OVX Gen овариектомирани третиран с Genistein, OVX Api овариектомирани третиран с екстракт на Apium
 * P ≤ 0.05 vs Co, ** P ≤ 0.01 vs Co, # P ≤ 0.05 vs OVX, ## P ≤ 0.01 vs OVX, мкм µm

Фигура 2. 3. 3. Ефект на Genistein и екстракт на Apium върху хистоморфологичните параметри обем на трабекулната кост (%), дебелина на трабекулната кост (µm), ширина на кортикалната кост (µm), брой трабекулни ламели и трабекулна микроархитектура в епифиза и метафиза на фемурална кост



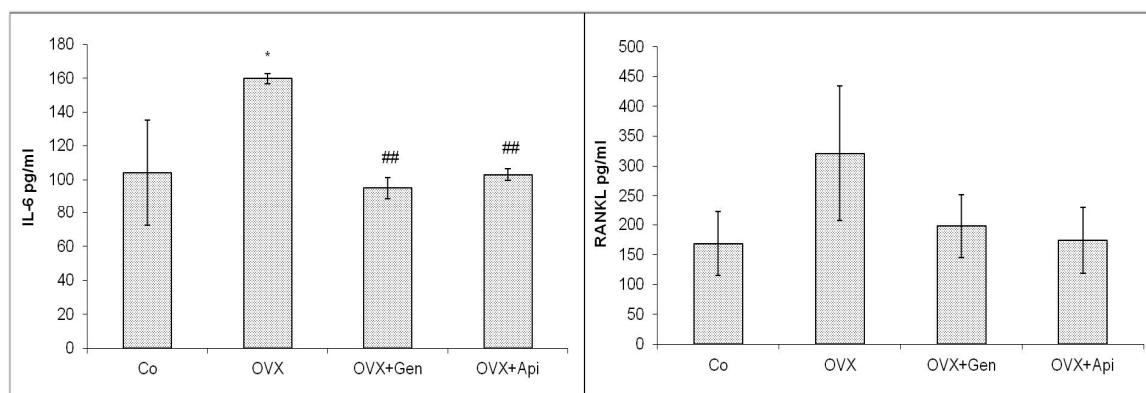
Co контрол шам оперирани, OVX контрол овариектомирани, OVX Gen овариектомирани третиран с Genistein, OVX Api овариектомирани третиран с екстракт на Apium

Фигура 2. 3. 4. Ефект на Genistein и екстракт на Apium върху хистоморфологичните параметри обем на трабекулната част (%), дебелина на трабекулната част (µm), ширина на кортикалната част (µm), брой трабекулни ламели и трабекулна микроархитектура в епифиза и метафиза на тибялна кост

След овариектомия дебелината на трабекулите е понижена значително. За разлика от третирането с Genistein прилагането на екстракт на *Arīum* има изразен благоприятен ефект върху този показател. Обобщените данни показват, че екстракт на *Arīum* има изразен благоприятен ефект върху трабекулната микроархитектура, за разлика от наличието на слаб или никакъв ефект след продължително третиране с Genistein.

2.4 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. 2. 4. 1. 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 *Arīum* или Genistein превантира настъпващото след овариектомия нарастване на IL-6 и RANKL в серума.



Co контрол шам оперирани, OVX контрол овариектомирани, OVX Gen овариектомирани третиранни с Genistein, OVX Api овариектомирани третиранни с екстракт на *Arīum*
 * $P \leq 0.05$ vs Co, ## $P \leq 0.01$ vs OVX

Фигура 2. 4. 1. Ефект на Genistein и екстракт на *Arīum* върху серумите нива на (A) Интерлевкин 6 (IL-6), (B) Рецептор активиран NFκB лиганд (RANKL)

2.5 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. 2. 5. 1.

Таблица 2. 5. 1. Периартикуларен едем при *Carrageenan*-индуцирана инфламаторна реакция (Обема на отока е измерен плетизмометрично)

Група, третиране	Периартикуларен едем (ml)
Контрол	1.94 ± 0.05
OVX	3.11 ± 0.3*
OVX, Genistein	2.53 ± 0.14 [#]
OVX, Apium	2.42 ± 0.11 [#]

*P ≤ 0.05 vs Контрол, [#]P ≤ 0.05 vs OVX, Контрол шам-оперирани, OVX овариектомирани

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

3. 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. Ноцицептивния 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 3. 1.

Таблица 3. 1. Ефект на аналгин (*metamizol*) върху Carrageenan-индуцирана хипералгезия (Ноцицептивните прагове са определени с Plantar heat тест и Hind paw pressure тест)

Група, третиране	Plantar heat тест (s)	Hind paw pressure тест (g.cm ⁻²)
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 ^{##}	7.21 ± 0.9 ^{##}
OVX, Genistein, аналгин	15.77 ± 0.9 ^{**}	14.2 ± 1.2 ^{**}
OVX, Apium	9.38 ± 0.9 ^{####}	8.2 ± 0.1 ^{####}
OVX, Apium, аналгин	14.5 ± 1.5 [*]	13.5 ± 2.1 [*]

*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

4. Нитроксидергична модулация на опиоидната толерантност/ зависимост

4.1. Модулация на поведенските реакции

В тази серия експерименти паралелно с изследването на поведенските реакции е изследвано влиянието на нитроксидергични трансмитерни механизми върху аналгетичното действие на Морфин. Установено е, че ED₅₀ за аналгетичния ефект на Морфин при наивни плъхове е 4.9 ± 0.6 mg/kg. При комбинирано прилагане на Морфин и L-NAME ED₅₀ за аналгетичния ефект на Морфин се увеличава над 3 пъти и достига 17.2 ± 1.6 mg/kg. Резултатите от квантитативния анализ на поведенските реакции са представени на Табл.4. 1.1. 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).

Таблица 4. 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^a	42.5 ± 6.8^a
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^b	126.0 ± 19.3^b
L-NAME хронично третиране, абстиненция (G6)	$14.5 \pm 2.4_{c, d}$	$39.5 \pm 7.4_{c, d}$
Морфин остро третиране (G7)	7.2 ± 1.2	19.0 ± 6.1
Naloxone остро третиране (G8)	4.5 ± 0.4	13.5 ± 1.9

^aP ≤ 0.01 vs G4, ^bP ≤ 0.001 vs G1, ^cP ≤ 0.05 vs G4, ^dP ≤ 0.001 vs G5

Кумулативните стойности (точки/30 min) квантифициращи поведението са 12.0 ± 2.6 за наивните плъхове (група G4), 17.0 ± 3.7 за

плъховете третирани хронично с L-NAME (група G2) и 13.5 ± 1.9 за плъховете третирани остро с naloxone (група G8). 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. 4. 1. 2.

Таблица 4. 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^a
L-NAME, Морфин остро третиране (G3, ден 1)	15.33 ± 1.01^a
Морфин хронично третиране (G1)	7.45 ± 1.02
L-NAME, Морфин хронично третиране (G3)	13.84 ± 1.24^a

^aP \leq 0.001 vs G4

Данните показват, че латентното време за реакция спрямо еталониран инфрачервен лъч (Тест tail flick) при наивните плъхове (група G4) е 5.62 ± 0.62 s, което нараства на 14.81 ± 1.34 s при остро третиране с морфин (G1, ден 1) и на 15.33 ± 1.01 s след предварително третиране с L-NAME и остро третиране с морфин (G3, ден 1). Хронично третиране с морфин в продължение на 5 последователни дни (група G1, ден 5) резултира в развитие на толерантност към аналгетичното действие на морфин и понижаване на латентното време до 7.43 ± 1.01 s. 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 ± 1.24 s. Резултатите от тази

серия експерименти са представени на Табл. 4. 1. 2.

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. В този етап основната симптоматика на абстинентния синдром, доминирана от вокализация при допир, агресивност, душене, чесане, гризане е по-изразена при група G1, отколкото при група G3. 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 третирани хронично с L-NAME (G6). При тези животни абстинентния синдром е доминиран от душене, чесане, хиперактивност, търсене, изправяне. След 7 дни хронично третиране с морфин загубата на телесно тегло на животните с абстиненция (G5) е 10.1 ± 1.1 г, която намалява достоверно на 7.4 ± 0.9 г ($P \leq 0.05$) 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 ± 2.6 , докато на плъховете хронично третирани с морфин е 42.5 ± 6.8 (G1). Кумулативната стойност, квантифицираща поведението при животните с naloxone-преципитирана абстиненция (G5) е 126.0 ± 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 ± 7.4 , която е над 3 пъти по-малка от тази при животните от група G5 (Табл. 4. 1. 1).

4.2 Модулация на сърдечно-съдовата дейност

Резултатите показват, че след първата инжекция на морфин настъпва транзиторна хипотония и брадикардия (група D1). Анализа на данните показва, че първото инжектиране на морфин понижава систолното артериално кръвно налягане (САН) с 39 ± 9 %, диастолното артериално кръвно налягане (ДАН) с 59 ± 10 % и средното артериално кръвно налягане (МАН) с 52 ± 10 %. Едновременно с транзиторната хипотония настъпва и значителна брадикардия. Данните показват, че след първата инжекция на морфин понижението на пулсовата честота (ПЧ) е 78 ± 8 %. Резултатите от проведените изследвания са представени на Табл. 4. 2. 1.

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. 4. 2. 1.).

Таблица 4. 2. 1. 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)
САН	- 39 ± 9	2 ± 1^a	- 46 ± 7	- 39 ± 10
ДАН	- 59 ± 10	1 ± 2^a	- 58 ± 10	- 52 ± 12
МАН	- 52 ± 10	1 ± 2^a	- 52 ± 6	- 46 ± 12
ПЧ	- 78 ± 8	- 13 ± 6^a	- 89 ± 1	- 73 ± 8

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

^aP ≤ 0.001 vs I (D1)

Предварителното третиране с L-NAME напълно антагонизира развиването на толерантност към действието на морфин върху хемодинамиката. Данните показват, че повторното инжектиране на морфин предизвиква изменения на САН, ДАН, МАН и ПЧ, които са идентични с

промените, предизвикани от първото въвеждане на морфин. Статистическият анализ на данните представени на Табл. 4. 2. 1. показва, че не съществуват разлики между хемодинамичните показатели в I (D2) и II (D2).

Данните показват, че индуцираната от L-NAME NOS инхибиция *per se* предизвиква незначителни хипотония и брадикардия. В друга серия експерименти същата схема на фармакологично третиране с морфин е приложена, след като животните са били предварително третирани с L-Arginine. Данните получени от тези експерименти са представени в Табл.4.2.2.

Таблица 4. 2. 2. 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 в присъствие на L-Arginine без (D3) и със (D4) предварително третиране с L-NAME

Артериално налягане	I и II инжектиране на Морфин (група животни)			
	I (D3)	II (D3)	I (D4)	II (D4)
САН	- 42 ± 9	7 ± 2 ^a	- 42 ± 4	- 21 ± 6 ^b
ДАН	- 58 ± 8	6 ± 4 ^a	- 53 ± 7	- 29 ± 9 ^b
МАН	- 53 ± 7	7 ± 3 ^a	- 50 ± 10	- 26 ± 6 ^b
ПЧ	- 81 ± 6	- 26 ± 10 ^a	- 71 ± 9	- 62 ± 10 ^b

САН систолно артериално кръвно налягане, ДАН диастолно артериално кръвно налягане, МАН средно артериално кръвно налягане, ПЧ пулсова честота
^a P ≤ 0.001 vs I (G3), ^b P ≤ 0.01 vs I (G4)

Анализът на данните показва, че L-Arginine *per se* не променя действие на Морфин върху сърдечно-съдовата система и не оказва влияние върху развитието на толерантност към неговите хемодинамични ефекти (Табл. 4. 2. 2). Данните показват, че L-Arginine приложен в доза 300 mg/kg намалява на потискащото действие на L-NAME 6 mg/kg по отношение появата и развитието на толерантност към хемодинамичните ефекти на Морфин (Табл. 4. 2. 1. и Табл. 4. 2. 2).

4.3 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. 4. 3. 1.

Таблица 4. 3. 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
125	2.74 ± 0.29 ^a	117.62 ± 14.63 ^a	28.84 ± 3.58	38.75 ± 3.77
500	2.26 ± 1.21 ^a	107.52 ± 9.70 ^a	19.11 ± 2.14	23.75 ± 1.21

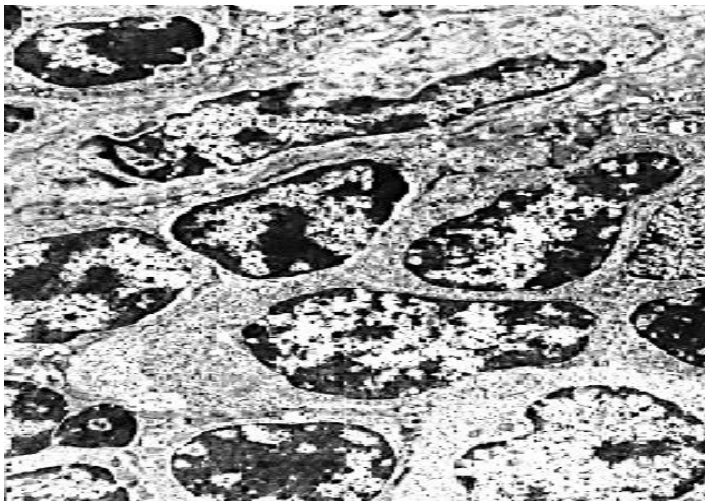
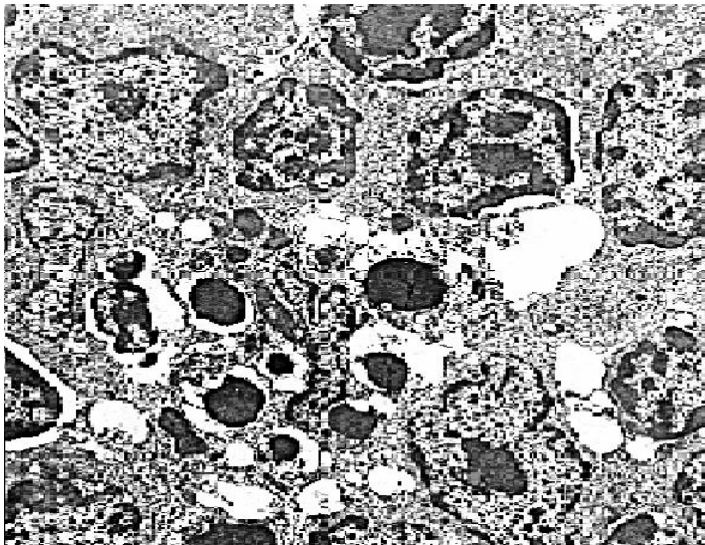
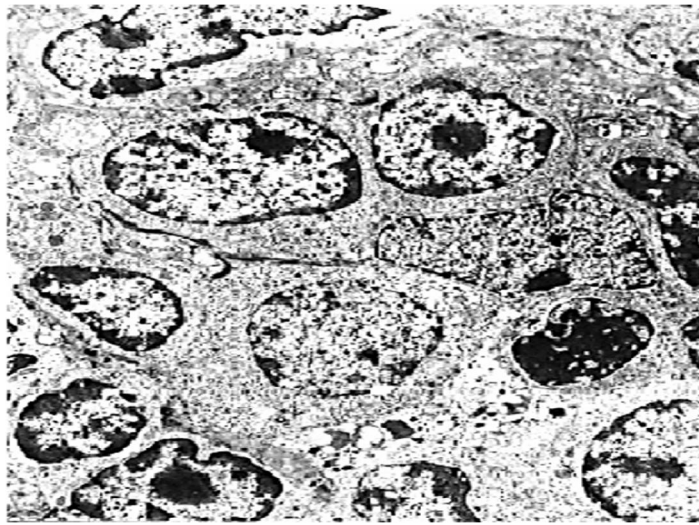
^aP ≤ 0.001 vs G4

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).

4.4 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).

Електронно-микроскопска картина на ултраструктурата на непроменена тимусна клетка е представена на Фиг. 4. 4.1А. Типични ултраструктурни изменения в тимоцитите в резултат на хронично третиране с морфин са представени на Фиг. 4. 4. 1В. 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 (Фиг. 4. 4. 1С).

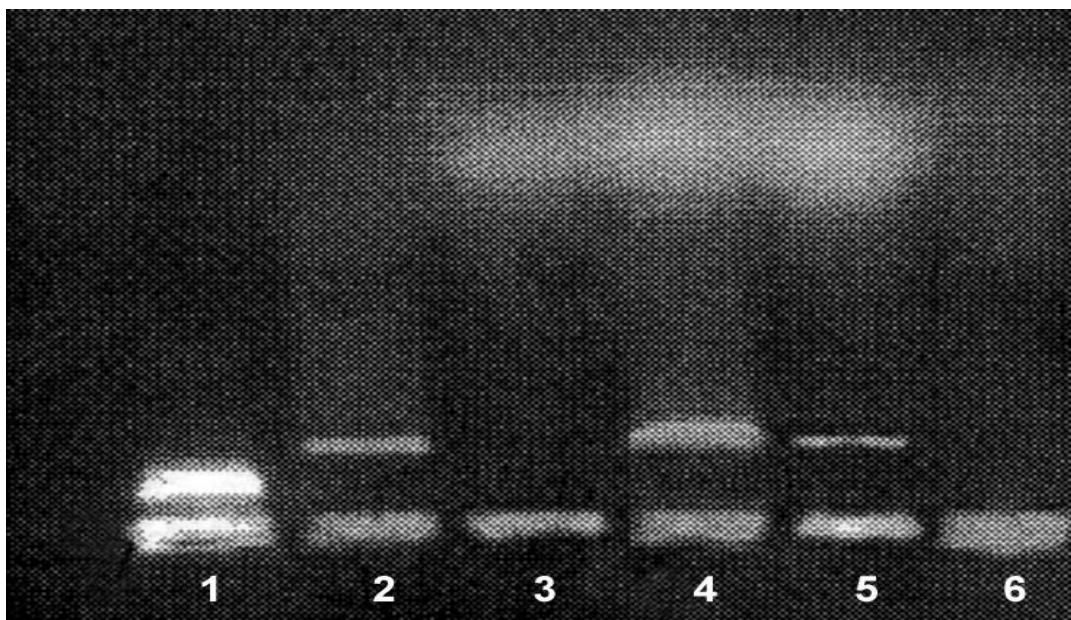


Контрол (А),
Морфин (В),
Морфин и L-NAME (С),
скала на маркировката 5 μ м

Фигура 4. 4. 1. Ултраструктурни промени в тимусните клетки след хронично третиране с Морфин и L-NAME

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.

Представителни за тази изследвания електрофоретични трасета са представени на Фиг. 4. 4. 2.



ДНК линия 1, Контрол линии 2 и 4, хронично третиране с Морфин линия 3, хронично третиране с Морфин и L-NAME линия 5, продукти на ДНК деградация линия 6

Фигура 4. 4. 2. Агароза гел електрофореза на ДНК изолирана от тимоцити на плъх

4.5. NADPH diaphorase активност в стволите ядра на главния мозък

Експресията на NADPH diaphorase активност е изследвана 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. Характерното синьо оцветяване е локализирано предимно в аксона и тялото на неврона. По-големия брой NADPH diaphorase позитивни неврони в PAG имат елиптична или мултиполарна форма и малки до средни размери. NADPH diaphorase позитивните неврони в DRN са по-малобройни, елонгирани или фузиформени, с малки до средни размери. Голям е броя на NADPH diaphorase позитивните неврони в PPN и LTN. Те имат мултиполарна, триангуларна или елонгирана форма и средни до големи размери. Денситометричните изследвания доказват наличие на добре проявена NADPH diaphorase активност във всички изследвани ядра. Детайлизирани резултатите от тези изследвания са представени в Табл. 4. 5. 1.

Таблица 4. 5. 1. Денситометрична 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^a	175.4 ± 3.4^a	138.4 ± 3.2^a	142.7 ± 4.1^a
	(N 797)	(N 1694)	(N 1019)	(N 2192)
G2	120.0 ± 4.7a	143.5 ± 7.3a	117.6 ± 4.1a	121.4 ± 3.9a
	(N 1894)	(N 907)	(N 1290)	(N 598)
G3	147.2 ± 4.6a	153.6 ± 7.7a	128.1 ± 4.6a	127.3 ± 5.1a
	(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 ± 5.8a	241.6 ± 7.2a	239.5 ± 6.7a	253.3 ± 1.1a
	(N 2259)	(N 807)	(N 1902)	(N 207)
G6	238.4 ± 5.6ab	237.6 ± 5.9ab	237.9 ± 5.1ab	242.5 ± 8.4ab
	(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)

^a P ≤ 0.001 vs G4, ^b 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 морфин 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 стволни 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).

VI. АНАЛИЗ И ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

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

Тривиална истина е, че висцералната болка, която изпитват пациентите е една от най-интензивните по характер и от най-честите по проява. Всеобщо правило е, че болката е неприятно изживяване със значителен емоционален компонент. Най-често прилаганите експериментални модели за изследване на ноцицепцията и аналгезията са моделите, при които се използват малки лабораторни животни, най-често плъх. Главните сигнали за механична, термична, химична, електрическа или възпалителна болка възникнала след прилагане на алгогенен стимул са моторни, поведенчески и автономни реакции и вокализация. По-адекватни и патогенетично насочени за изследване на висцерална болка са експерименталните модели, при които се прилага бърза дистензия на кухи висцерални органи (Le Bars et al., 2001, Cerverro, F., 1994, , Traub et al., 1995, Ness, T. J., Gebhart, G. F., 1988). При тези модели животните трябва да са без анестезия и естествено в тях се предизвикват значителни неприятни усещания и по-тежки вегетативни реакции (Hara et al. 1999, Yamamory et al., 1996). Ако се приложи анестезия клиничната болкова симптоматика и оценката на ноцицептивните прагове ще бъдат видоизменени много съществено (Robbins, A., Sato, Y., 1991). В многобройни изследвания е показано, че прилагането на алгогенни стимули на будни неанестезирани животни понижава съществено артериалното кръвно налягане (Le Bars et al., 2001). В съгласие с експерименталните резултати са данни от редица клинични наблюдения, които показват, че пациенти, на които е направена фронтална лоботомия имат непроменена сензорна болкова чувствителност, но са загубили изцяло емоционалните и мотивационни измерения, които при хора са неотменим компонент на изпитваната болка (Sweet., W. H., 1973). Като имахме предвид цитираните

по-горе данни и в съгласие със застъпването от нас становището, че 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, може да бъде използван като подходящ препарат от миометриум при моделни изследвания за изясняване на някои еквиваленти на висцералната болка на органно и тъкънно ниво. В настоящото изследване 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 миометриума при различни схеми за фармакологично повлияване. Тези възможности бяха успешно утилизирани за изследване на ефекта на аналгин върху тонуса и контрактилитета на миометриума при състояние на симулиран „дисменорея“ подобен синдром.

Данните показват убедително, че аналгин може да бъде прилаган като ефикасно лекарство срещу колики и болки при дисменорея. Важна особеност е, че аналгин потиска по-силно контракциите и тонуса на миометриума след стимулация с PG F_{2α}. Изясняването на механизма на това действие е извън обсега на дисертационния труд, но би могло да се допусне,

че това е резултат главно на инхибиране от аналгин на Ca^{2+} инфлукс в гладкомускулните клетки на миометриума. Получените в настоящото изследване резултати са в хармония с предишни пионерни изследвания на други български автори, които са показвали, че аналгин има инхибиторен ефект върху биоелектричната и съкратителна активност на миометриума на будни неанестезирани кучета (Milenov et al., 1983).

*Фармакотерапевтичен потенциал на екстракт от *Apium podiflorum* (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 (Jee, W. S. S., Yao, W., 2001, Lelovas et al., 2008). В настоящите изследвания бяха използвани неинвазивни методи за измерване на костна минералната плътност (BMD) и костното минерално съдържание (BMC), които са приемат като най-добри клинични методи за обективизиране и количествено определяне на костната деминерализация и деструкция при остеопороза. 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.

В следващите етапи на изследователската ни програма проследихме някои от най-съществените изменения, които настъпват на тъканно и молекулно ниво при проявена остеопороза и ефекта от продължителната субституция на естрогеновия дефицит с екстракт от *Arīum*. Първоначално изследванията бяха фокусирани върху изясняване на промените в микроархитектурата и особеностите в хистоморфологията на дългите кости на групи остеопоротични плъхове, които са получавали дългосрочна фитофармакологична субституция с Genistein или екстракт от *Arīum* или са били третирани с плацебо. До скоро доминираше становището, че след овариектомия деструктивните изменения в костната система не засягат трабекулната костна тъкан в епифизата на дългите кости (Westerlind et al., 1997, Jee, W. S. S., Yao, W., 2001). Данните от настоящото проучване дават убедителни доказателства, че настъпват едновременни и паралелни изменения в трабекуларната костна микроархитектура както в епифизните, така и в метафизните сегменти на фемурална и тибиялна кост. Хроничното третиране с екстракт от *Arīum* възпрепятства развитието на тежки деструктивни изменения в костната микроархитектура на фемуралната и тибиялна кост. При тази схема на фармакотерапевтично третиране стойностите за обема, дебелината, броя на трабекулите и дебелината на кортикалния костен слой в епифизните и метафизните сегменти на двете дълги кости не се различават от тези на плъховете от контролната група без предизвикана остеопороза. Забележителното в получените резултати е, че Genistein има по-слаб ефект върху костната микроархитектура на остеопоротично изменените фемурална и тибиялна кости. Установените от нас количествени данни за настъпване на деструктивни изменения на костната микроструктура едновременно в епифизните и метафизни сегменти на фемуралната и тибиялна кост при експериментално предизвикана остеопароза са в хармония с данни от хистоморфологични проучвания на други автори (Hidaka et al., 2006, Bitto et al., 20, Yogesh et al.,

2011). В клиничната практика има консенсус, че най-честата проява на остеопороза при възрастни пациенти е фрактура на проксималния сегмент на фемуралната кост. Настоящите изследвания предоставят убедителни данни, че суплементираща терапия с екстракт от *Arrium* при естроген-дефицит предизвикана остеопороза (модел на пост-климактерична остеопороза при жени) има силно изразен благоприятен ефект срещу костната деструкция, който се верифицира със съществено подобряване на основните параметри на костната микроархитектура.

Болката по костите е тривиален симптом на метаболитните увреждания на костната система, най-често деструкция при остеопороза или болест на Paget. Засега обаче цялостния патогенетичен механизъм на болката съпътстваща тези заболявания не е изяснена в детайли. Най-приемлива от съществуващите многобройни хипотези е, че болката се дължи на сензитизация на периосталните ноцицептори вследствие увреждане на тъканите или възпаление, но са възможни и структурни поражения на нервните фибри от директна компресия на тъканите (Genigi, C., 1998). Добре известно е, че инфламаторните медиатори (брадикинин, хистамин, цитокини, PG F2 α , nerve growth factor), които се генерират след увреждания на тъканите променят реактивността на трансдукционните процеси в периферните нервни терминали и понижават прага за тяхната активация. Инфламаторните медиатори повишават активността на остеокластите. Нарушенията на костния метаболизъм водят до микрофрактури, което може да бъде едно приемливо обяснение за възникването на остеопоротична болка (Orita et al., 2012). 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 *Artem* би представлявал фитопрепарат с реален терапевтичен потенциал при постклимактерична остеопороза.

Carageenan-предизвиканите възпаление и едем представляват класически модели на остра възпалителна имунна реакция. Прилагайки този модел установихме, че екстракта от *Artem* намалява достоверно големината на отока и понижава силно механичната и термична хипералгезия. Резултати, които показват, че екстракт от *Artem* има изразен анти-инфламаторен ефект са представени и от други автори (Lewis, D. A., 1985). Най-вероятно анти-инфламаторния и противоболков ефект на екстракта от *Artem* има мултифункционална патогенеза. Може да се допусне, че компонентите на екстракта проявяват изразена антиоксидантна активност и потискат генерирането на супероксидни радикали. Едновременно с това може да потисне производството и освобождаването на инфламаторни медиатори (хистамин, 5-НТ, брадикинин, простагландини) и / или да антагонизира ефекта на про-инфламаторните цитокини (IL-6). Данните от тези изследвания имат значителен терапевтичен потенциал и могат да представляват съществен интерес за фармацевтичната индустрия.

Провеждането на следващите изследвания, което беше насочено към проучване на влиянието на екстракт от *Artem* върху някои съществени патофизиологични процеси при остеопороза, представлява естествено продължение на проведените преди тях проучвания. Понастоящем е детайлно документирано, че естрадиола е основния регулатор на костната хомеостаза чрез директно действие върху активността на остеобластите и остеокластите. Естрогените блокират синтеза / освобождаването на проинфламаторни цитокини и производството на имунокомпетентни клетки в костния мозък (Pacifci, R., 1996, Sipos et al., 2009). Понастоящем има достатъчно убедителни доказателства, че проинфламаторни цитокини като IL-6, TNF α , RANKL стимулират развитието и активността на остеокластите (Sipos et al., 2005, Ginaldi et al., 2005), които имат централно значение за

развитието на пост - климактерична остеопороза. Типична находка е повишеното ниво на IL-6 да корелира със симптомите на остеопороза и / или болка по костите при отсъствие на други съпътстващи патологични състояния засягащи костната система (Theoharides et al., 2002). Резултатите от настоящото изследване показват, че Genistein и екстракт от *Arіum* предизвикват значително понижени нива на IL-6 в плазмата на третираните животни.

Известно е, че фитоестрогена Genistein (изофлавоноид) стимулира естрогеновите ER- β рецептори, но все още неговият принципен механизъм на действие не е изяснен напълно. Многобройните хипотези, които определят като водещ механизъм на действие на фитоестрогените, варират от инхибиране на активността на ДНК II топоизомеразата, регулация на целуларни регулаторни центрове, антиангиогенеза и / или антиоксидантна активност и други. В последните няколко години се лансира хипотезата, че фитоестрогените могат да потиснат целуларната пролиферация чрез модулация на сигналните каскади на TGF β 1 (трансформиращ растежен фактор β 1 (Kim et al., 1998, Wang, J., Wang, S., 2012). Целината (*Arіum nodiflorum*) показва едни от най-високите нива на антиоксидантна активност, което корелира с съдържанието на високи нива на тотални феноли и флавоноиди, установени във фитопродукти от растението (Stankovic, M. S., 2011, Morales et al., 2012). Установените в настоящите изследвания съдържания на тотални феноли и флавоноиди в екстракта от *Arіum* са в същите граници, както тези съобщените в други изследвания по отношение на стебла и корени на целина. До сега в достъпната литература не сме открили данни за доказан фармакотерапевтичен потенциал на екстракт от *Arіum* срещу постклимактерична остеопороза, както и за значителна антиоксидантна активност на фитопрепарати от части на растението.

Резултатите от проведените изследвания на фармакотерапевтичните ефекти и някои интегративни и целуларни механизми на действие на екстракта от *Arīum* при синдром на експериментална постклимактерична остеопороза и сравняването му с ефектите на Genistein дават възможност тези резултати да бъдат предпазливо екстраполирани по отношение на терапевтичния потенциал на фитопрепарати от *Arīum* (целина).

Arīum (целина) е популярно и широко разпространено в страната растение, което може да бъде евтина и лесна за добиване суровина за фармацевтичната индустрия.

Екстракт от *Arīum nodiflorum* (целина) проявява много благоприятни ефекти срещу основната клиинико-анатомична и параклинична симптоматика при модел на постклимактерична остеопороза.

Екстракт от *Arīum nodiflorum* (целина) е с по-добър ефект от ефекта на Genistein, би предизвиквал по-малко нежелани лекарствени реакции, отколкото хормоно-заместителна терапия с естрогени и може да бъде прилаган през целия следклимактеричен период.

Екстракт от *Arīum nodiflorum* (целина) може да бъде ефикасно средство за профилактика на фрактури на костите при възрастни жени в пост - климактеричния период на живота им.

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

Както беше предвидено във възприетата теоретична и експериментална платформа на изследванията хроничното третиране с Морфин предизвика развитие на типични толерантност и зависимост към неговите аналгетични ефекти. Данни от същата серия експерименти показват, че след хронично прилагане на L-NAME не настъпват промени в характера и амплитудата на поведенските симптоми и аналгетичното действие на Морфин, когато е

приложен еднократно. Когато обаче хроничното третиране с Морфин е в комбинация с L-NAME, се отсрочва настъпването и облекчават симптомите на толерантност и зависимост към Морфин. Подобни данни са били представени в предишни публикации и от други автори (Heinzen, E. L., Polack, G. M., 2004, Ozdemir et al., 2011). Инжектирането на Naloxone на животни, които имат добре проявена характерна зависимост към Морфин предизвиква типичен абстинентен опиоиден синдром. Характерните прояви и интензивност на абстинентните симптоми са облекчени в много голяма степен при животни, които са третирани хронично с комбинацията Морфин и L-NAME. Тези данни са в подкрепа на становището, че инхибирането на ключови звена от нитроксидергичния път NOS / NO може да забави развитието и намали интензивността на синдрома на опиоидна абстиненция (Adams et al., 1993).

В настоящите изследвания за първи път спецификата и интензивността, с които се проявява симптомокомплекса на опиоидната толерантност / зависимост / абстиненция е оценена количествено посредством създадена от нас квантитативна точкова скала. Резултатите от проведените изследвания показват, че квантитативната кумулативна скала дава възможност за детайлизиран и адекватен анализ на цялостната поведенска симптоматика при синдром на опиоидна толерантност/ зависимост / абстиненция. Прилагането на такъв методологичен подход би спомогнало за избягване на несигурността и двусмислието при оценяване на характера и интензитета на поведенските реакции посредством прилаганата досега дескриптивна скала за оценка на поведението.

Резултатите показват, че всички изследвани животни в тази серия експерименти реагират на единична доза Морфин с изразени брадикардия и хипотония. Тези данни са в хармония с изследвания на други автори, които

съобщават за подобни не-аналгетични, кардиоваскуларни ефекти на опиоидите (Headrick et al., 2012). Данните от настоящото изследване показват, че когато същата доза Морфин е инжектирана след 48 часа повторно, не настъпват съществени промени в честотата на пулса и артериалното кръвно налягане, т.е. налице е изразена толерантност към кардиоваскуларните ефекти на Морфин. Развитието на такава толерантност е блокирано напълно когато животните са третирани предварително с NOS-инхибитор L-NAME. *Per se* ефекта на L-NAME върху хемодинамиката е типичен отговор на сърдечно-съдовата система след NOS / NO инхибиция, проявен с умерена хипертония и брадикардия. Неочакван резултат са данните, че прилагането на L-Arginine не променя ефекта на L-NAME върху развитието на толерантност към кардиоваскуларните ефекти на Морфин. Данните от настоящите експерименти не дават задоволително обяснение на този факт. Хипотетично би могло да се допусне, че дозата L-Arginine приложена в тази серия експерименти е недостатъчна, за да бъде преодоляна неселективната NOS / NO инхибиция от L-NAME. Резултатите от тази серия експерименти показват, че блокада на трансдукционните нитроксидергични процеси може да забави / възпрепятства развитието на толерантност към хемодинамичните ефекти на опиоидите. Получените резултати не верифицират коя изоформа на NOS е принципния таргет на това действие.

Общоприето е, че най-съществените кардиоваскуларни ефекти на опиоидите са периферна вазодилатация и намалено съдово съпротивление, барорецепторна инхибиция и брадикардия вследствие на NOS / NO зависимо освобождаване на хистамин и вагусова активация на периферно и централно ниво. В последно време е лансирана хипотезата, че важна роля в локалните процеси на кардиоваскуларна регулация играе т. н. cross - talk между опиоидите, генерирани в миокарда и β -адреноцепторите (Pepe et al.,

2004). В съгласие с това становище са данните, че миокарда продуцира продинорфини и проенкефлини (Headrick et al., 2012).

Данните от настоящите изследвания показваха, че хроничното третиране с Морфин силно потиска лимфоцитната пролиферация. Това е в хармония с добре познати клинични и експериментални данни, че опиоидите са мощни супресори на имунните реакции (Lysle et al., 1993). За разлика от Морфин-индуцираното потискане на пролиферацията, хроничното третиране с L-NAME предизвиква силна стимулация на лимфоцитната пролиферация. Когато обаче, е проведено комбинирано хронично третиране с Морфин и L-NAME пролиферацията на лимфоцитите не се променя. Би могло да се предположи, че в тази ситуация протичат паралелни процеси на Морфин-индуцирана супресия и L-NAME-индуцирана стимулация на лимфоцитната пролиферация. Тези два противоположни процеси протичат едновременно и най-вероятно неутрализират своите ефекти чрез различни механизми.

Идеологията на проведените в тази серия експерименти е опиоид-индуцираните ефекти и тяхната модулация посредством промени на активността на системата NOS / NO да бъдат проследени по-нататък на целуларно, субцелуларно и молекулно нива. Получените LM и EM данни от показват, че хроничното третиране с Морфин активира процеси на апоптоза, която е манифестирана със значителни и специфични увреждания на мембраната, цитоплазмата и ядрото на тимоцитите. Резултатите от тези изследвания са в съгласие с данни на други автори за Морфин-индуцирана апоптоза в клетките на ЦНС (Liu et al., 2013). Настоящите изследвания показват, че прилагането на L-NAME практически изцяло възпрепятства развитието на Морфин-индуцирана апоптоза, като същевременно силно понижава броя на клетките с апоптоза. Този ефект би могъл да се дължи,

както предполагат други автори, на засилената „кливидж“ активност на caspase-3 и caspase-8 (Wang et al., 2001). Нашите ЕМ изследвания разкриват значителни увреждания на геномната ДНК предизвикани от хроничното третиране с Морфин, представени като обширни сегменти на фрагментирана ДНК и голямо количество ниско-молекулна ДНК. Тези деструктивни изменения в строежа на геномната ДНК са значително по-слаби и ограничени в много по-малки зони когато хроничното третиране с Морфин е комбинирано с L-NAME. Данните от настоящите изследвания са в съгласие със становището, че инхибиране на системата NOS / NO може да противодейства на процесите на апоптоза чрез активиране на „NF- κ B nuclear binding“ (Welters et al., 2000).

Последната част от проведените изследвания е планирана да се проучи директно с хистохимични методи влиянието на опиоид-индуцирани толерантност, зависимост, абстиненция върху ензимната активност на NADPH diaphorase (NOS) в основните субкортикални ядра на мозъка, които обработват ноцицептивна информация. Резултатите показаха, че във всички изследвани субкортикални ядра се експресира значителна NADPH diaphorase активност с максимум в PAG. Хроничното третиране с Морфин резултира в силно инхибиране на NADPH diaphorase във всички изследвани структури. Обратно на това еднократното инжектиране на Морфин предизвиква несъществени промени в активността на ензима с тенденция към увеличаване на броя на клетките експресиращи NADPH diaphorase. Хроничното третиране с L-NAME предизвиква очаквания ефект на по-интензивна NADPH diaphorase инхибиция. Тези резултати са в хармония с данни на други автори, които намират, че инхибирането на невроналната NOS намалява толерантността към аналгетичното действие на Морфин като понижава активността на p38 MAPK (Liu et al., 2006). Резултатите от проведените изследвания показват, че при naloxone-преципитиран

абстинентен синдром настъпва достоверно увеличение на NADPH diaphorase активност независимо от наличието / отсъствието на предварително третиране с L-NAME, което е в съгласие с данни представени по-рано от други автори, че активността на NADPH diaphorase в ЦНС на наивни плъхове не е промени след еднократното инжектиране на naloxone (Kumer, S., Bhargava, H. N., 1997). Данните от настоящите изследвания показват, че инхибицията на NADPH diaphorase активност при хронично третиране с Морфин в комбинация с L-NAME е приблизително същата както инхибицията на ензимната активност, предизвикана от хроничното третиране с Морфин без L-NAME. Тези данни са в известна степен неочаквани и за тяхното прецизиране ще са необходими допълнителни изследвания, което е извън обсега на настоящия дисертационен труд.

Проведените изследвания на интегративно, тъкънно, целуларно, субцелуларно и молекулно ниво представляват широко-обхватно и комплексно проучване на Морфин-индуцираните толерантност, зависимост и абстиненция върху адекватни експериментални модели. Данните от тази 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. Тази методология има предимство с оглед избягване на недостатъците на методите за дескриптивно оценяване на поведението.

VII. ОБОБЩЕНИЕ

Изследванията в обхвата на предложения дисертационен труд са планирани в два аспекта. В теоретичен аспект са проведени комплексни изследвания, проведени на интегративно (*in vivo*), тъканно, органно, целуларно и молекулно равнища на аналгетичното действие на Морфин и развитието на опиоидна толерантност, зависимост, абстиненция. Получените данни показват, че нитроксидергични механизми (NOS / NO) играят основна роля в модулацията на опиоидните толерантност, зависимост и абстиненция. Показано е, че блокирането на системата NOS/ NO забавя развитието на толерантност към аналгетичното действие на Морфин и може да намали интензивността на аверзивните реакции при хронично третиране с опиоиди.

В също такива многопластови изследвания е показано, че екстракта от *Apium nodiflorum* (целина) има много благоприятен терапевтичен ефект при пост-климактерична остеопороза, без да причинява съществени нежелани странични реакции. Третирането с екстракт от *Apium* възпрепятства появата на деструктивните изменения в костната система и облекчава остеопоротичната болка. Доказано е, че аналгин може да бъде много ефективно лекарство срещу висцералната болка при дисменорея.

В приложен аспект е създаден и валидиран експериментален модел на „*In vitro* еквивалент“ на спастична висцерална болка при хормонално симулиран дисменорея-подобен функционален синдром. За този модел е използван изолиран гладкомускулен препарат от рог на утерус на плъх, което позволява да бъдат квантифицирани ефектите върху спонтанната и евокирана съкратителна активност и тонуса на миометриума при различни схеми за фармакологично повлияване.

Създадена е нова кумулативна скала за количествено оценяване на интензивността на отделните симптоми при синдром на експериментални опиоидна толерантност, зависимост, абстиненция. 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.

VIII. ИЗВОДИ

1. Създаденият и валидиран експериментален модел на екс виво /ин витро експериментален модел на хормонално-обусловена „дисменорея“ позволява да бъдат квантифицирани ефектите върху спонтанната и евокирана съкратителна активност и тонуса на миоетриума при различни схеми за фармакологично повлияване.

1.1. PG F2 α потенцира много силно спонтанните контракции и умерено повишава тонуса на препаратите изолирани от група „дисменорея.“

1.2. Аналгин потиска по-силно контракциите и тонуса на миоетриума след стимулация с PG F2 α .

2. Използваният остеопороза-подобен синдром в овариектомирани женски плъхове е адекватен модел на постклимактерична остеопороза у жени и това се потвърждава от проведените методи за обективизиране: клинични (BMD и ВМС), лабораторни (промени на серумните нива на IL-6 и RANKL) и имуно-хистохимично охарактеризиране на костните промени при развитие на остеопороза.

2.1. Третирането с екстракт от *Apium* забавя развитието на остеопороза у плъхове със значително по-слабо изразена костна деструкция, верифицирана със значително подобрените параметри на BMD и ВМС.

2.2. Прилагането на екстракт на *Apium* или Genistein превентира настъпващото след овариектомия нарастване на IL-6 и RANKL в серума.

2.3. Хроничното третиране с екстракт от *Apium* и Genistein възпрепятстват развитието на тежки деструктивни изменения в костната микроархитектура на фемуралната и тибиялна кост. Благоприятният ефект е отчетливо изразен при третиране с *Apium*.

2.4. Настоящото изследване показва, че развитието на остеопороза се съпътства със значителна хипералгезия (PPT), а фармакотерапията с Genistein или екстракт от *Apium* намалява значително болковата чувствителност на третираните животни в сравнение с контролите третираните с плацебо както и *carrageenan*-индуцираната инфламаторна

реакция.

2.5. Екстрактът от *Apium nodiflorum* (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.

3. Приложената кумулативна скала за количествена оценка на интензивността на отделните симптоми при синдром на експериментални опиоидна толерантност, зависимост, абстиненция, която намалява субективизма при оценяване на характера и интензитета на поведенските реакции спрямо прилаганата досега дескриптивна скала за оценка на поведението.

3.1. Характерните прояви и интензивност на абстинентните симптоми са облекчени в много голяма степен при животни, хронично третирани с комбинацията морфин и L-NAME. Блокадата на трансдукционните нитроксидергични процеси може да забави/възпрепятства развитието на толерантност към хемодинамичните ефекти на опиоидите.

3.2 Прилагането на L-NAME практически изцяло възпрепятства развитието на 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.

3.2. Хроничното третиране с морфин или L-NAME предизвиква силно понижаване на експресията на NADPH diaphorase в, специфичните субкортикални структури в главния мозък (PAG, DRN, PPN, LDT), ангажирани с процесирването на възходящата ноцицептивна сигнализация. При naloxone-преципитиран абстинентен синдром настъпва достоверно увеличение на NADPH diaphorase активност независимо от наличието/отсъствието на предварително третиране с L-NAME.

IX. ПРИНОСИ

Приноси с методологичен характер

1. Създаден е и е валидиран експериментален модел на „*In vitro* еквивалент“ на спастична висцерална болка при хормонално симулиран дисменорея-подобен функционален синдром.
2. Валидиран е остеопороза-подобен синдром в овариоектомирани 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).
3. Създадена е нова кумулативна скала за количествена оценка 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 контролите.
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 понижава броя на клетките с апоптоза без да променя пролиферацията на лимфоцитите.

X. ЛИТЕРАТУРА

Власковска, М. Опиоиди и неuropeптиди: механизми на опиоидната аналгезия и толерантност / зависимост. Неврохимични основи за фармакологични въздействия. Автореферат на дисертационен труд доктор на науките. София, 2002.

Власковска, М., Сурчева, С., Овчаров, Р. Значение ендогенных опиоидов и простагландинов в действии анальгина (метамизола) и верапамила. Фармакол. Токсикол. 52, 25-29, 1989.

Adams, M. L., Kalicki, J. M., Meyer, E. R., Cicero, T. J. Inhibition of morphine withdrawal syndrome by a nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Life Sci.* 52, PL245-PL249, 1993.

Aggleton, J. P. *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction.* Wiley-Liss, NY, 1992.

Aghajanian, G. K., Kogan, J. H., Moghaddam, B. Opiate withdrawal increases glutamate and aspartate efflux in the locus coeruleus: an in vivo microdialysis study. *Brain. Res.* 636, 126-130, 1994.

Apkarian, A. V., Sosa, Y., Sonty, S., Levy, R. M., Harden, R. N., Parrish, T. B., Gitelman, D. R. Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. *J. Neurosci.* 24, 10410-10415, 2004.

Arts, J., Kuiper, G. G., Janssen, J. M., Gustafsson, J. A., Lowik, C. V., Pols, H. A., van Leeuwen, J. P. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HPO cells. *Endocrinology* 138, 5067-5070, 1997.

Ataga, A. E., Epton, H. A. S., Frost, R. R. Effect of virus infection on the concentration of furanocoumarins in celery (*Apium graveolens* L. var. *dulce* Mill. D. C.). *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 42, 161-168, 1993.

Atta, A. E., Alkofahi, A. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of some Jordanian medicinal plant extracts. *J. Ethnopharmacol.* 60, 117-124, 1998.

Babey, A. M., Kolesnikov, Y., Cheng, J., Inturrisi, C. E., Trifilletti, R. R., Pasternak, G. W. Nitric oxide and opioid tolerance. *Neuropharmacology* 33, 1463-1470, 1994.

Baha, A., Alam, T., Varshney, M., Khan, S. A. Hepatoprotective activity of two plants belonging to the Apiaceae and the Euphorbiaceae family. *J. Ethnopharmacol.* 79, 313-316, 2002.

Ballock, R. T., O'Keefe, R. J. The biology of the growth plate. *J. Bone Joint Surg.* 85, 715-726, 2003.

Bandler, R., Keay, K. A. Columnar organization of the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. *Prog. Brain Res.* 107, 285-300, 1996.

- Beck, J. J., Chou, S.-C. The structural diversity of phthalides from the Apiaceae. *J. Natur. Product.* 70, 891-900, 2007.
- Benyamin, R., Trescot, A. M., Datta, S. Opioid complications and side effects. *Pain Physician* 11(opioid special issue), 105-120, 2008.
- Berke, J. D. Learning and memory mechanisms involved in compulsive drug use and relaps. *Methods Molec. Medicine* 79, 75-1-1, 2003.
- Berkley, K. J. Primary dysmenorrhea. *Pain. Clinical Updates*, 1-8, 2013.
- Bhargava, H. N., Thorat, S. N. Evidence for a role of nitric oxide of the central nervous system in morphine abstinence syndrome. *Pharmacology* 52, 86-91, 1996.
- Bielefeldt, K., Gebhardt, G. F. Visceral pain: Basic mechanisms. In: Wall and Melzack's Textbook of Pain. Eds.: McMahon, S. B., Kolzenburg, M., pp. 721-736. Elsevier, Philadelphia, 2006.
- Bitto, A., Burnett, B. P., Polito, F., Marini, H., Levy, R. M., Armbruster, M. A., Minutoli, L., Di Stefano, V., Irrera, N., Antoci, S., Granese, R., Squadrito, F., Altavilla, D. Effect of genistein aglicone in osteoporotic, ovariectomized rats: a comparison with alendronate, raloxifen and oestradiol. *Br. J. Pharmacol.* 155, 896-905, 2008.
- Bitto, A., Marini, H., Burnett, B. P., Polito, F., Levy, R. M., Irrera, N., Minutoli, L., Adamo, E. B., Squadrito, F., Altavilla, D. Genistein aglycone effect on bone mass is not enhanced by supplemental calcium and vitamin D3: A dose ranging experimental study. *Phytomedicine* 18, 879-886, 2011.
- Black, D. M., Greenspan, S. L., Ensrud, K. E. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *New Engl. J. Med.* 349, 1207-1215, 2003.
- Black, D. M., Reid, I. R., Boonen, S. The effect of 3 versus 6 years of zoledronic acid treatment of osteoporosis: a randomized extension to the HORIZON-pivotal fracture trial. *J. Bone Res.* 27, 243-254, 2012.
- Breivik, H. Opioids in non-cancer pain. Indications and controversies. *Europ. J. Pain* 9, 127-130, 2005.
- Buccafusco, J. J., Terry, A. V., Shuster, L, Jr., Spinal NMDA receptor-nitric oxide mediation of the expression of morphine withdrawal symptoms in the rat. *Brain Res.* 679, 189-199, 1995.
- Burnstock, G. Purine-mediated signaling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 182-188, 2001.
- Cameron, I. T., Cambell, S. Nitric oxide in the endometrium. *Human Reprod. Update* 4, 565-569, 1998.
- Campbell, J. N. The fifth vital sign revisited. *Pain* 157, 3-4, 2016.

Cappendijk, S. L. T., De Vries, R., Dzoljic, M. R. Inhibitory effect of nitric oxide (NO) synthase inhibitors on naloxone-precipitated withdrawal syndrome in morphine-dependent mice. *Neurosci. Letts.* 162, 97-100, 1993.

*Cerverro, F. *Physiol. Rev.* 74, 95-138, 1994.

Chan, W. Y., Hill, J. C. Determination of menstrual prostaglandin levels in nondysmenorrheic and dysmenorrheic subjects. *Prostaglandins* 15, 365-375, 1978.

Chah, L. A. Opioids - mechanism of action. *Aust. Prescr.* 19, 63-65, 1996.

Chandrasekharan, N. V., Hu, D., Lamar, K., Turepu, R., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., Simmons, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic / antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 13926-13931, 2002.

Cherny, N. I. The management of cancer pain. *CA Cancer J. Clin.* 50, 70-116, 2000.

Cherny, N. I., Ripamonti, C., Pereira, J. Strategies to manage the adverse effects of oral morphine: an evidence-based report. *J. Clin. Oncol.* 19, 2542-2554, 2001.

Christie, M. J. Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Brit. J. Pharmacol.* 154, 384-96, 2008.

Christie, M. J., Williams, J. T., Osborne, P. B., Bellchambers, C. E. Where is the locus in opioid withdrawal? *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 134-140, 1997.

Christopher, M., Herndon, R., Hutchison, W., Hildegard, J. B., Stacy, Z. A., Chen, J. T., Farnsworth, D. D., Dang, D., Fermo, J. D. Management of chronic nonmalignant pain with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Joint opinion statement of the ambulatory care, cardiology, and pain and palliative care practice and research networks of the American College of Clinical Pharmacy. *Pharmacotherapy* 28, 6, 2008.

Coghill, R. C., Talbot, J. D., Evans, A. C., Mayer, E., Gjedde, A., Bushnell, M. C., Duncan, G. H. Distributed processing of pain and vibration by the human brain. *J. Neurosci.* 14, 4095-4108, 1994.

Conn, P. J. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 205-237, 2003.

Cosman, F. Anabolic and antiresorptive therapy for osteoporosis: combination and sequential approaches. *Curr. Osteoporosis Rep.* 12, 385-395, 2014.

Cousins, M. J., Brennan, F., Carr, D. B. Pain relief: a universal human right. *Pain* 112, 1-4, 2004.

Coxib and traditional NSAID trialists' (CNT) collaboration. New York, 2013.

Crandall, C. J., Newberry, S. J., Diamant, A. Comparative effectiveness of pharmacologic treatments to prevent fractures: an updated systemic review. *Ann. Intern. Med.* 161, 711-723, 2014.

- Cummings, S. R., Melton, L. J. Epidemiology and outcomes of osteoporosis. *Lancet* 359, 17-1767, 2002.
- D' Amour, F. E., Smith, D. L. A method of determining loss of pain sensation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 72, 74-77, 1941.
- Davies, N. M., Good, R. L., Roupe, K. L. Cyclooxygenase 3: axiom, dogma, anomaly or splice error? Not as easy as 1, 2, 3. *J. Pharmacol. Pharm. Sci.*,7, 217-226, 2004.
- Dawood, M. Y. Primary dysmenorrhea: advances in pathogenesis and management. *Ostet. Gynecol.* 108, 428-441, 2006.
- DiChiara, G., North, R. A. Neurobiology of opiate abuse. *TIPS* 13, 185-193, 1992.
- Dickenson, A. H., Kiffer, B. Opiates: basic mechanisms. In: Eds. McMahon, S. B., Koltzenburg, M. Wall and Malzack's Textbook of Pain, pp. 427-442. Elsevier, New York, 2006.
- Dietis, N., Rowbotham, D. J., Lambert, D. G. Opioid receptor subtypes: fact or artifact? *Brit. J. Anaesth.* 107, 8-18, 2011.
- Duncan, H. Cortical porosis: a morphological evaluation. In: Proc. Workshop on bone morphometry. Ed.: Jaworski, Z. F. G., pp. 78-83. Univ. Ottawa Press, 1976.
- Eide, P. K. Wind-up and NMDA receptor from a clinical perspective. *Eur. J. Pain* 4, 5-15, 2000.
- Elliott, K., Minami, N., Kolesnikov, Y. A., Pasternak, G. W., Inturrisi, C. E. The NMDA receptor antagonists, LY274614 and MK-801, and the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the mu-opioid morphine but not to kappa opioids. *Pain* 56, 69-75, 1994.
- Engblom, D., Saha, S., Engström, L. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nature Neurosci.* 6,1137-1138, 2003.
- Ettarh, R., Cullen, A., Calamai, A. NSAIDs and cell proliferation in colorectal cancer *Pharmaceuticals* 3, 2007-2021, 2010.
- Fardet, L., Petersen, I., Nazareth, I. Prevalence of long-term of oral glucocorticoid prescriptions in the UK over the past 20 years. *Rheumatology* 50, 1982-1990, 2011.
- Fedorowicz, Z., Nasser, M., Jagennath, V. A., Beaman, J.H., Ejaz, K., Van Zuuren, E. J. Beta-2-adrenoceptor agonists for dysmenorrhea. *Cochrane Database Syst. Rev.* 5. 14-20, 2013.
- Feng, Y., He, X., Yang, Y., Chao, D., Lazarus, L. H., Xia, Y. Current research on opioid receptor function. *Curr. Drug Targets.* 13, 230-246, 2012.
- Fields, H. L. Painful dysfunction of the nervous system: pain. McGraw Hill, NY, 1987.

- Fields, H. L., Basbaum, A. I., Heinricher, M. M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Wall and Melzack's Textbook of Pain. Eds.: McMahon, S. B., Kolzenburg, M., pp. 125-142. Elsevier, Philadelphia, 2006.
- Fields, H. L., Heinricher, M. M., Mason, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Ann. Rev. Neurosci.* 14, 219-245, 1991.
- Flake, Z. A., Scalley, R. G., Bailey, A. G. Practical selection of antiemetics. *Am. Fam. Physician* 69, 1169-1174, 2004.
- Friedman, P. A. Agents affecting mineral ion homeostasis and bone turnover. In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Eds.: Brunton L. L., Chabner, B. A., Kollmann, B. C., pp. 1275-1306. McGraw Hill, NY, 2011.
- Fu, X., Froicu, D., Sinatra, R. Anatomic and physiologic principles of pain. In: Essentials of Pain management. Eds.: Vadivelu, N., Urman, R. D. Hines, R. L., pp. 31-44. Springer, NY, 2011.
- *Gennari, C. In: Osteoporosis in clinical practice. Eds.: Geusens, P., Lindsay, R. pp. 69-72. Springer Verlag Ltd., London. 1998.
- Giamberardino, M. A. Women and visceral pain are the reproductive organs the main protagonists? *Eur. J. Pain* 12, 257-260, 2008.
- Ginaldi, L., Di Benedetto, M. C. De Martinis, M. Osteoporosis, inflammation, and ageing. *Immun. Ageing* 2, 14, 2005. Available from: [p://www.immunityageing.com/content/2/1/14](http://www.immunityageing.com/content/2/1/14).
- Grosser, T., Fries, S., FitzGerald, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J. Clin. Invest.* 116, 4-15, 2006.
- Grosser, T., Smyth, E. M., FitzGerald, G. A. Grosser T, Smyth E, FitzGerald G.A. Grosser, Tilo, et al. Anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic agents: Pharmacotherapy of gout. In: Eds.: Brunton, L. L., Chabner, B. A., Knollmann, B. C. Brunton L.L., Chabner B.A., Knollmann B.C. Eds. Laurence L. Brunton, et al. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, pp. 959-1004, McGraw-Hill, New York, 2011.
- *Hara, K., Saito, Y., Kirihara, Y., Yamada, Y., Sakura, S., Kosaka, Y. *Anesth. Analg.* 89, 422-427, 1999.
- Harel, Z. Dysmenorrhea in adolescents. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1135, 185-195, 2008.
- Headrick, J. P., Pepe, S., Peart, J. N. Non-analgesic effects of opioids and their receptor systems. *Curr. Pharm. Res.* 18, 6090-6100, 2012.
- Heinricher, M. M., Tavares, I., Leith, J. L., Lumb, B. M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res. Rev.* 60, 214-225, 2009.
- Heinzen, E. L., Polack, G. M. The development of morphine antinociceptive tolerance in nitric oxide synthase deficient mice. *Biochem. Pharmacol.* 67, 735-741, 2004.

- Helmstetter, F. J., Tershner, S. A., Poore, L. H. Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Brain Res.* 779, 104-118, 1998.
- Herman, B. H., Vocci, F., Bridge, P. The effects of NMDA receptor antagonists and nitric oxide synthase inhibitors on opioid tolerance and withdrawal. *Neuropsychopharmacol.* 13, 269-293, 1995.
- Hibbs, J. B. Jr., Traintor, R. R., Vavrin, Z., Rachlin, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 87-94, 1988.
- Hidaka, S., Okamoto, Y., Uchiyama, S., Nakatsuma, A. Hashimoto, K. Ohnishi, S. T., Yamaguchi, M. Royal jelly prevents osteoporosis in rats: beneficial effects in ovariectomy model. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 3, 339-348, 2006.
- Hou, Y-N., Vlaskovska, M., Cebers, G., Kasakov, L., Liljequist, S., Terenius, L. A μ -receptor opioid agonist induces AP-1 and NF- κ B transcription factor activity in primary culture of rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 212, 159-162, 1996.
- Hughes, J., Smith, T., Kosterlitz, H., Fothergill, L., Morgan, B., Morris, H. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258, 577-580, 1975.
- Hunt, S. P., Urch, C. E. Pain, opiates and addiction. In: Eds. McMahon, S. B., Koltzenburg, M. Wall and Malzack's Textbook of Pain, pp. 349-360. Elsevier, New York, 2006.
- Iakovides S., Avidon, I., Baker, F. C. What we know about primary dysmenorrhea today: a critical review. *Human Reprod. Update* 24, 37-53, 2015.
- Julius, D., Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210, 2001.
- Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Baeuerle, P. A. Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF- κ B in primary neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9618-9622, 1995.
- Khosla, S. The OPG / RANKL / RANK system. *Endocrinology* 142, 5050-5055, 2001.
- Kim, H., Peterson, T. G., Barnes, S. Mechanism of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor β signaling pathways. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1418S-1425S, 1998.
- Koob, G. F. Drug addiction: The Yin and Yang of hedonic homeostasis. *Neuron* 16, 893-896, 1996.
- Koob, G. F., Le Moal, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278, 52-58, 1997.
- Lathe, P. M., Champaneria, R., Khan, K. S. Dysmenorrhea. *Clin. Evid. (On line)* 813, 2011.
- Le Bars, D. The whole body receptive field of dorsal horn multireceptive neurons. *Brain res. Rev.* 40, 29-44, 2002.

- *Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S. W. *Pharmacol. Rev.* 53, 597-652, 2001.
- Lee, W. S. S., Yao, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J. Musculoskel. Neuron Interact.* 1, 193-207, 2001.
- Lelovas, P. P., Xanthos, T. T., Thoma, S. E., Liritis, G. P., Dontas, I. A. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp. Med.* 58, 424-430, 2008.
- Lenz, F. A., Gracely, R. H., Romanovski, A. J., Hope, E. J., Rowland, L. H., Dougherty, P. M. Stimulation in the human somatosensory thalamus can reproduce both the affective and sensory dimensions of previously experienced pain. *Nat. Med.* 1, 910-913, 1995.
- Lenz, F. A., Casey, L. A., Jones, E. J., Willis, W. D. *The Human Pain System. Experimental and Clinical Perspectives.* Cambridge University Press, Cambridge, 2010.
- Levine, J. P. Effective strategies to identify postmenopausal women at risk for osteoporosis. *Geriatrics* 62, 22-30, 2007.
- Lewiecki, E. M. Role of sclerostin in bone and cartilage and its potential as a therapeutic target in onediseases. *Ther. Advans. Musculoskelet. Dis.* 6, 48-57, 2014.
- Lewis, D. A. The anti-inflammatory action of celery *Apium graveolens* L. (Fam. Umbelliferae). *Int. J. Crude Drug Res.* 23, 27-33, 1985.
- Lim, S. Y., Bolster, M. B. Current approaches to osteoporosis treatment. *Current Opinion Rheumatol.* 27, 216-224, 2015.
- Liu, L-W., Lu, J., Wang, c-H., Fu, S-K., Li, Q., Lin, F-Q. Neuronal apoptosis in morphine addiction and its molecular mechanism. *Int. J. Clinic. Exp. Med.* 6, 540-545, 2013.
- Liu, L-W., Wang, c-H., Cui, Y., Mo, L-Q., Zhi, J-L., Sun, S-N., Wang, Y-L., Yu, H-M., Zhao, C-M. Feng, J-Q., Cheng, P-X. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase antagonizes morphine antinociceptive tolerance by decreasing activation of p38 MAPK in the spinal microglia. *Neurosci. Letts.* 410, 174-177, 2006.
- Lopshire, J. C., Nicol, G. D. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J. Neurosci.* 18, 6081-6092, 1998.
- Lorenz, J., Minoshima, S., Casey, K. L., Keeping pain out of mind: the role of the dorsolateral prefrontal cortex in pain modulation. *Brain*, 126, 1079-1091, 2003.
- Lysle, D. T., Coussons, M. E., Watts, V. J., Bennett, E. N., Dykstra, L. A. Morphine-induced alteration of immune status: dose dependency, compartment specificity and antagonism by naltrexone. *J. Pharmacol.* 265, 1071-1078, 1993.
- Macfarlane, G. J., Jones, G. T., McBeth, J. Epidemiology of pain. In: Wall and Melzack's *Textbook of Pain.* Eds.: McMahon, S. B., Kolzenburg, M., pp. 1199-1214. Elsevier, NY, 2006.

- Majeed, N. H., Przewlocka, B., Machelska, H., Przewlocki, R. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. *Neuropharmacology* 33, 189-192, 1994.
- Manolagas, S. C., Kousteni, S., Jilka, R. L. Sex steroids and bone. *Recent Progr. Horm. Res.* 57, 385-409, 2002.
- Marchand, S. Applied pain neurophysiology. In *Pharmacology of Pain*. Eds.: P. Beaulieu, Lussier, D., Porreca, F., Dickenson, A., pp 3-26. IASP Press, Seattle, 2010.
- Marchand, S., Arsenault, P. Spatial summation for pain perception: interaction of inhibitory and excitatory mechanisms. *Pain* 95, 201-206, 2002.
- Marini, H., Minutoli, L., Polito, F., Bitto, A., Altavilla, D., Atteritano, M. OPG and sRANKL serum concentrations in osteopenic, postmenopausal women after 2-year genistein administration. *J. Bone Mineral Res.* 23, 715-720, 2008.
- Marinova, Ts. Epithelial framework reorganization during human thymus involution. *Gerontology* 51, 14-18, 2005.
- Marinova, Ts., Savov, A., Kremenski, I., Vlaskovska, M. Molecular and cellular alterations in rat thymus after long term treatment with morphine and L-NAME. *Balkan J. Med. Gen.* 3, 41-44, 2000.
- Martin, W. R. Pharmacology of opioids. *Pharmacol. Rev.* 35, 283-323, 1983.
- Maruotti, N., Corrado, A., Cantatore, F. P. Osteoporosis and rheumatic diseases. *Reumatismo* 66, 125-135, 2014.
- Matthens, H. W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dolle, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roquez, B.P., Kieffer, B. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the μ -opioid-receptor gene. *Nature* 819-823, 1996.
- McLellan, A. T., Lewis, D. C., O'Brien, C. P. C., Kleber, H. D. Drug dependence, a chronic medical illness: Implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *JAMA* 13, 1689-1695, 2000.
- McCall, T. B., Palmer, R. M. J., Moncada, S. Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur. J. Pharmacol.* 102, 234-238, 1991.
- McClung, M., Harris, S. T., Miller, P. D. Bisphosphonate therapy for osteoporosis: benefits, risks, and drug holiday. *Am. J. Med.* 126, 13-20, 2013.
- McNicol, E., Horowicz-Mehler, N., Fisk, R. A. Management of opioid side effects in cancer-related and chronic noncancer pain: a systematic review. *J. Pain*, 4, 231-256, 2003.
- Melzack, R., Wall, P. D. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150, 971-979, 1965.

- Merskey, H., Bogduk, N. Pain terms: A list with definitions and notes on usage recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. In: Pain Terms. A current list with definitions and notes on usage. Eds.: Merskey, H., Bogduk, N., Part III, pp. 209-214. IASP Press, Seattle, 1994.
- Miean, T., Mohamed, S. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin and Apigenin content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3106-3112, 2001.
- Milenov, K., Kasakov, L., Kehaiov, P. Analgin and Lidol. Effect on the motor and myoelectrical activity of uterus in unanaesthetized dogs. *Med. Biol. Inform.* 5, 16-18, 1983.
- Mirkin, S., Pickar, J. H. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): a review of clinical data. *Maturitas* 80, 52-57, 2015.
- Molinoff, P. B. Neurotransmission and the central nervous system. In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Eds.: Brunton L. L., Chabner, B. A., Kollmann, B. C., pp. 363-395. McGraw Hill, NY, 2011.
- Momin, R. A., Nair, M. G. Moquiticidal, nematicidal and anti-fungal compounds from *Apium graveolens* L. seeds. *J. Agric. Food Chem.* 49, 142-145, 2001.
- Morales, P., Carvalho, A. M., Sanches-Mata, M. C., Camara, M., Mollina, M., Ferreira, I. C. F. R. Tocopherol composition and antioxidant activity of Spanish wild vegetables. *Genet. Resour. Crop. Ev.* 59, 851-863, 2012.
- Morony, S., Warmington, K., Adamu, S. The inhibition of RANKL causes greater suppression of bone resorption and hypercalcemia compared with bisphosphonates in two models of humoral hypercalcemia of malignancy. *Endocrinology* 146, 3235-3243, 2005.
- Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051-3064, 1992.
- National Osteoporosis Foundation. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. Washington, USA, 2014.
- *Ness, T. J., Gebhart, G. F. *Brain Res.* 450, 153-169, 1988.
- Nestler, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Rev. Neurosci.* 2, 119-128, 2001.
- Nikolic, N., Cvetcovic, D., Todorovic M. A characterization of content, composition and antioxidant capacity of phenolic compounds in celery roots. *Ital. J. Food Chem.* 23, 214-219, 2011.
- Niv, D., Devor, M. Chronic pain as a disease in its own right. *Pain Practice* 4, 179-181, 2004.
- Nylander, I., Vlaskovska, M., Terenius, L. The effects of morphine treatment and morphine withdrawal on the dynorphin and enkephalin systems in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology* 118, 391-400, 1995a.
- Nylander, I., Vlaskovska, M., Terenius, L., Brain dynorphin and enkephalin systems in Fischer and Lewis rats: effects of morphine tolerance and withdrawal. *Brain Res.* 683, 25-35, 1995b.

Oakley, J. C. Spinal cord stimulation for neuropathic pain. In: Pain Research and Clinical Management. Ed.: Simpson, B. A., vol. 15. Electrical stimulation and the relief of pain, pp. 87-119, Elsevier, Amsterdam, 2003.

O' Brien, C. P. Drug addiction. In: Eds.: Brunton, L. L., Chabner, B. A., Knollmann, B. C. Brunton L.L., Chabner B.A., Knollmann B.C. Eds. Laurence L. Brunton, et al. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, pp. 649-668, McGraw-Hill, New York, 2011.

O'Neill, L. A. J., Kaltschmidt, C. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. TINS 20, 252-258, 1997.

Orita, S., Ohtori, S., Inoue, G., Takahashi, K. Osteoporotic pain. In: Osteoporosis. Eds.: Dionyssiotis, Y. ISBN: 978-953-51-0026-3, InTech, 2012.

Available from: <http://www.intechopen.com/books/osteoporosis/osteoporotic-pain>

Ozdemir, E., Bageivan, I., Durmus, N., Altun, A., Gursoy, S. The nitric oxide –GMP signaling pathway plays a role in tolerance to analgesic affect of morphine. Can. J. Physiol. Pharmacol. 89, 89-95, 2011.

Pacifici, R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. J. Bone Mineral Res. 11, 1043-1051, 1996.

Parfitt, A. M., Mathews, C. H. E., Villanueva, A. R., Kleerekoper, M., Frame, B., Rao, D. S. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and osteoporosis. Implication for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. J. Clin. Invest. 72, 1396-1409, 1983.

Parfitt, A. M., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., Meunier, P. J., Ott, S. M., Recker, R. R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. J. Bone Mineral Res. 2, 595-610, 1987.

Pepe, S., Van den Brink, O. W., Lakatta, E. G., Xiao, R. P. Cross-talk of opioid peptide receptor and beta-adrenergic receptor signaling in the heart. Cardiovasc. Res. 63, 414-422, 2004.

Pereira, J. V., Modesto-Filho, J., Agra, M. F., Barbosa-Filho, J. M. Plant and plant-derived compounds employed in prevention of the osteoporosis. Acta Farm. Bonearense 21, 223-234, 2002.

Pinkerton, J. Dysmenorrhea. Merck Manuals, 1-6, 2015.

Praveen, R. P. N., Knaus, E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 11, 81-110, 2008.

Pulichino, A. M., Rowland, S., Wu, T. Prostacyclin antagonism reduces pain and inflammation in rodent models of hyperalgesia and chronic arthritis. J. Pharmacol. Exp. Ther. 319, 1043-1050, 2006.

Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J. (Eds.). Rang and Dale's Pharmacology. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, PA, 2007.

- Rasmussen, K., Brodsky, M., Inturrisi, Ch. E. NMDA antagonists and clonidine block c-Fos expression during morphine withdrawal. *Synapse* 20, 68-74, 1995.
- Recker, R. R., Kimmel, D. B., Dempster, D., Weinstein, R. S., Wronski, T. J., Burr, D. B. Issues in modern histomorphometry. *Bone* 49, 955-964, 2011.
- Rees, M. C. P., Di Marzo, V., Tippins, J. R. Leukotriens release by endometrium and myometrium throughout the menstrual cycle in dysmenorrhea and menorrhagia. *J. Endocrinol.* 113, 291-295, 1987.
- Reginster, J. Y., Neuprez, A., Dardenne, N. Efficacy and safety of currently marketed antiosteoporosis medications. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 28, 809-834, 2014.
- Reinold, H., Ahmadi, S., Depner, U. B., Layh, B., Heindl, C., Hamza, M., Pahl, A., Brune, K., Narumiya, S., Muller, U. Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. *J. Clin. Invest.* 115, 673-679. 2005.
- *Robbins, A., Sato, Y. J. *Autonom. Nerv. Syst.* 33, 55-63, 1991.
- Robinson, T. E., Berridge, K. C. *Addiction. Ann. Rev. Psychology* 54, 25-53, 2003
- Rouzer, C. A., Marnett, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J. Lipid Res.* 50, 29-34, 2009.
- Roy, S., Loh, H. H. Effects of opioids on the immune system. *Neurochem. Res.* 21, 1375-1386, 1996.
- Sanchez-Alavez, M., Tabarean, I. V., Behrens, M. M., Bartfai, T. Ceramide mediates the rapid phase of febrile response to IL-1beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 2904-2908, 2006.
- Scherer-Singler, U., Vincent, S. R., Kimura, H., Mc Geer, E. G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH diaphorase histochemistry. *J. Neurosci. Meth.* 9, 229-234, 1983.
- Self, D. W., Nestler, E. J. Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction. *Ann. Rev. Neurosci.* 18, 463-495, 1995.
- Self, D. W., Nestler, E. J. Relapse to drug-seeking: neural and molecular mechanisms. *Drug Alcohol Dependence*, 51, 49 - 60, 1998.
- Shad, A. A., Shah, H. U., Bakht, J., Chiudhary M. I., Ullah, A. J. Nutraceutical potential and bioassay of *Apium graveolens* L. grown in Khyber Pakhtunkhwa Pakistan. *J. Med. Plants Res.* 5, 5160-5166, 2011.
- Silva, B. C., Costa, A. G., Cusano, N. E. Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton. *J. Endocrinol. Invest.* 34, 801-810, 2011.
- Sipailiene, A., Venskutonis, P. R., Sarkinas, A., Cypiene, V. Composition and antimicrobial activity of celery (*Apium graveolens*) leaf and root extract obtained with liquid carbon dioxide. *Acta Hort.* 677, 71-77, 2005.

- Sipos, W., Pietschmann, P., Rauner, M., Kersch-Schindl, K., Patsch, J. Pathophysiology of osteoporosis. *Wien Med. Wochenschr.* 159, 230-234, 2009.
- Sipos, W., Tanaka, Y., Nakayamada, S., Okada, Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allerg.* 4, 325-328, 2005.
- Smart, D., Lambert, D. G. The stimulatory effects of opioids and their possible role in the development of tolerance. *TIPS* 17, 264-269, 1996.
- Stankovic, M. S. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium Peregrinum* L. extracts. *Kraguevac J. Sci.* 33, 63-72, 2011.
- Stuehr, D. J., Nathan, C. F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 169, 1543-1555, 1989.
- Subhardradevi, V., Khairunissa, K., Asokkumar, K., Umamaheswari, M., Sivashanmugam, A., Jagannath, P. Induction of apoptosis and cytotoxic activities of *Apium graveolens* Linn. using in vitro models. *Middle East J. Sci. Res.* 9, 90-94, 2011.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Rev.* 20, 345-357, 1999.
- Sultana, S., Ahmad, S., Jahangir, T., Sharma, S. Inhibitory effect of Celery seeds extract on chemically induced hepatocarcinogens modulation of all proliferation, metabolism and altered hepatic foci development. *Cancer Letts.* 221, 11-20, 2005.
- Surcheva, S., Sirakov, L., Sirakova, I. Opiate receptors in rat brain after morphine and nitrendipine treatment. *Med. Sci. Res.* 23, 477-479, 1995.
- Suter, M. R., Wen, Y. R., Decosterd, I., Ji, R. R. Do glial cells control pain? *Neuron Glia Biol.* 3, 255-268, 2007.
- *Sweet, W. H. *New Engl. J. Med.* 299, 1117-1125, 1973.
- Swegle, J. M., Logemann, C. Opioid-induced adverse effects. *Am. Fam. Physician* 74, 1347-1352, 2006.
- Teichtahl, H., Prodromidis, A., Miller, B. Sleep-disordered breathing in stable methadone programme patients: a pilot study. *Addiction* 96, 395-403, 2001.
- Terenius, L. Opiate tolerance and dependence: roles of receptors and endorphins. In: *Research Advances in Alcohol and Drug Problems* 8, pp. 1-21. Plenum Press, New York, 1984.
- Terman, G. W., Bonica, J. J., Loeser, J. D. Spinal mechanisms and their modulation. In: *Bonica's management of pain.* pp. 73-152. Lippincott Williams & Wilkins, NY, 2001.
- Theoharides, T. C., Boucher, W., Spear, K. Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 128, 344-350, 2002.
- *Traub, H. J., Stitt, S., Gebhart, G. G. *Brain Res.* 701, 175-182, 1995.

- Trescot, A., Datta, S., Lee, M., Hansen, H. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11 (opioid special issue), 133-153, 2008.
- Trescot, A. Clinical use of opioids. Treatment of chronic pain by medical approaches. In: Ed.: Deer, T.R. *Textbook on Patient Management*, pp. 99-110. American Academy of Pain Medicine NY, 2015.
- Trevor, A. J., Katzung, B. G., Kruidering-Hall, M. Trevor A.J., Katzung B.G., Kruidering-Hall M Trevor, Anthony J., et al. NSAIDs, Acetaminophen and drugs used in rheumatoid arthritis and gout. In: Eds.: Trevor, A. J., Katzung, B. G., Kruidering-Hall, M. Trevor A.J., Katzung B.G., Kruidering-Hall M Eds. Anthony J. Trevor, et al. *Katzung & Trevor's Pharmacology: Examination and Board Review*. McGraw-Hill, New York, 2015.
- Tsi, D., Das, N. P., Tan, B. K. Effects of aqueous Celery (*A. graveolens*) extract on lipid parameters of rat fed a high fat diet. *Planta Med.* 6, 18-21, 1995.
- Tsuda, M., Inoue, K., Salter, M. W. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small glia. *Trends Neurosci.* 28, 101-107, 2005.
- Tu, C. H., Niddam, D. M., Chao, H. T., Hen, L. F., Chen, Y. S., Wu, Y. T., Yeh, T. C., Ling, J. F., Hsieh, J. C. Brain morphological changes associated with cyclic menstrual pain. *Pain* 150, 462-468, 2010.
- Tu, C. H., Niddam, D. M., Chao, H. T., Liu, R. S., Hwang, R. J., Yeh, T. C., Hsien, J. C. Abnormal cerebral metabolism during menstrual pain in primary dysmenorrhea. *Nuroimage* 47, 28-35, 2009.
- Vane, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.* 231, 232-235, 1971.
- Vanegas, H., Schaible, H. G. Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord. *Prog. Neurobiol.* 64, 327-363, 2001.
- Vanegas, H., Schaible, H. G., Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory. *Brain Res. Rev.* 46, 295-309, 2004.
- Vicent, K. Pelvic pain in women: clinical and scientific aspects. *Current Opinion Support Palliat. Care* 5, 143-149, 2011.
- Vierck, C. J. Jr., Cannon, R. L., Fry, G., Maixner, W., Whitsel, B. L. Characteristics of temporal summation of second pain sensations elicited by brief contact of glabrous skin by a preheated thermode. *J. Neurophysiol.* 78, 992-1002, 1997.
- Vlaskovska, M., Kasakov, L. Nociceptin / Orphanin FQ: The novel peptide with multiple old regulatory functions. *Biomed. Rev.* 11, 1-17, 2000.
- Vlaskovska, M., Nylander, I., Schramm, M., Hahne, S., Kasakov, L., Terenius, L. Opiate modulation of dynorphine conversion in primary cultures of rat cerebral cortex. *Brain Res.* 760, 85-93, 1997.

- Vlaskovska, M., Schramm, M., Nylander, I., Kasakov, L., You, Z-B., Herrera-Marschitz, M., Terenius, L. Opioid effects on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and glutamate release in rat cerebral cortex in primary culture. *J. Neurochem.* 68, 517-524, 1997.
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E., Whistler, J. L. Opioid receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 73, 953-990, 2004.
- Walters, I. D., Menzebach, A., Goumon, Y., Cadet, P., Menges, T., Hughes, T. K., Hempelmann, G., Stefano, G. B. Morphine inhibits NF-kappaB nuclear binding in human neutrophils by a nitric oxide-dependent mechanism. *Anesthesiol.* 92, 1677-1684, 2000.
- Wang, J., Charboneau, R., Balasubramanian, S., Barke, R. A., Loh, H. H., Roy, S. Morphine modulates lymph node-derived T-lymphocyte function: role of caspase-3, -8, and nitric oxide. *J. Leucocyte. Biol.* 70, 527-536, 2001.
- Wang, J., Wang, S. The bone-protective affect of genistein in the animal model of bilateral ovariectomy: roles of phytoestrogens and PTH / PTHR1 against post-menopausal osteoporosis. *Int. J. Med. Sci.* 13, 56-70, 2012.
- Watts, N. B., Roux, C., Modlin, J. F. Infections in postmenopausal women with osteoporosis treated with denosumab or placebo: coincidence or causal association? *Osteoporosis Int.* 23, 327-337, 2012.
- Weissman, A. M., Hertz, A. J., Hansen, M. D., Johnson, S. R. The natural history of primary dysmenorrhea: a longitudinal study. *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 111, 345-352, 2004.
- Wesselmann, U. Syndromes of chronic pelvic and urogetital pain. *Pain Cliinical Updates XVI*, 1-4, 2008.
- Westerlind, K. C., Wronski, T. J., Ritman, E. L., Luo, Z-P., An, K-N., Bell, N. H., Turner, R. T. Estrogen regulates the rate of bone turnover but bone balance in ovariectomized rats is modulating by prevailing mechanical strain. *Proc. Med. Acad. Sci. USA* 94, 4199-4204, 1997.
- Wiech, K., Ploner, M., Tracey, I. Neurocognitive aspects of pain perception. *Trends Cogn. Sci.* 12, 306-313, 2008
- Willis, W. D., Jr. Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. *Philosophic. Transact. Royal Soc. London Biol. Sci.* 308, 253-270, 1985.
- Willis, W. D., Jr. Temperature perception and pain. In: *Comprehensive human physiology*. Eds.: Greger, R., Windhorst, U., pp. 677-696. Springer, Berlin, 1996.
- Windhorst, U. Bilateral organization of the brain. In: *Comprehensive human physiology*. Eds.: Greger, R., Windhorst, U., pp. 1137-1160. Springer, Berlin, 1996.
- Woolf, C. J. Wind up and central sensitization are not equivalent. *Pain* 66, 105-108, 1996.
- Woolf, C. J., Mannion, R. J. Neuropathic pain: etiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353, 1959-1964, 1999.

World Health Organization. Guidelines for preclinical evaluation and clinical trials in osteoporosis. Geneva, pp. 1-68, 1998.

Xie, W., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L., Simmons, D. L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2692-2696, 1991.

Xu, X. L., Gou, W. L., Wang, A. Y. Basic research and clinical applications of bisphosphonates in bone disease: what have we learned over the last 40 years. J. Transl. Med. 11, 303-321, 2013.

*Yamamory, K. T., Saito, Y. Kaneko, M., Kirihara, Y. Pain 40, 85-91, 1996.

Yaksh, T. L., Wallace, M. S. Yaksh T.L., Wallace M.S. Yaksh, Tony L., and Mark S. Wallace. Opioids, analgesia, and pain management. In: Eds.: Brunton, L. L., Chabner, B. A., Knollmann, B. C. Brunton L.L., Chabner B.A., Knollmann B.C. Eds. Laurence L. Brunton, et al. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, pp. 481-525. McGraw-Hill, New York, 2011.

Yogesh, H. S., Chandrashekar, V. M., Katti, H. R., Ganapati, S., Raghavendra, H. L., Gowda, G. K., Goplakrishna, B. Antiosteoporotic activity of aqueous-methanol extract of *Berberis aristata* in ovariectomized rats. J. Ethnopharmacol. 134, 334-338, 2011.

Zhou, K., Zhao, F., Liu, Z., Zhuang, Y., Chen, L., Qui, L. Triterpenoids and flavonoids from celery (*Apium graveolens*). J. Natur. Product. 72, 1563-1567, 2009.

XI. ПРИЛОЖЕНИЕ

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)

(<http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2014.990924>)

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)

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. S. 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.
4. S. Surcheva, A. Tsakova, M. Ratkova, K. Surchev, D. Peev, V. Bankova, P. Popivanov, L. Kasakov, L. Surchev, M. Vlaskovska. Beneficial effects of Apium Nodiflorum and Genistein on pain and inflammation in experimental model of osteoporosis. 15th World Congress on pain. 06 - 11. 10. 2014, Buenos Aires. PT008. (Отличен с награда на IASP)
5. M. Ratkova, K. Surchev, A. Tsakova, S. Surcheva, S., M. Vlaskovska. Pharmacological modulation of inflammatory hyperalgesia in osteoporotic female rats. VIII Congress of European Pain Federation EFIC, 9 - 12. 10. 2013, Florence.

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, Резюмета, стр. 32. – студент 3 курс
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. Резюмета, p102.

УЧАСТИЕ В НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ

1. Механизми на опиатната толерантност и зависимост. Фармакологична модулация чрез повлияване на нитроксидергични процеси. Дизайн и синтез на нови NOS-инхибитори и NO-донори. Л/617. Договор с Национален фонд " Научни изследвания" МОН, 1996-1999 г.
2. Проучвания на фармакологичния потенциал на български медицински растения при експериментална остеопороза: таксономични, фитохимични и *in vivo/in vitro* биомедицински изследвания. ДДВУ 02-75/2010 към МОНМ
3. *Ex vivo/in vitro* модели на висцерална болка (дисменорея и урогенитгален болков синдром). Изясняване механизма на възникване с цел оптимизиране на фармакологично въздействие - Договор № 29/2011 към СМН
4. Проучване на болката и възможностите за оптимизиране на фармакологичното ѝ повлияване при модел на експериментална остеопороза . Договор № 61/2012 към СМН