

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ПЛЕВЕН
ФАКУЛТЕТ „МЕДИЦИНА“
КАТЕДРА „ФИЗИОЛОГИЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ“

д-р Ивелина Иванова Химчева

**ЕФЕКТИ НА НОВИ АНАЛОЗИ НА
НОЦИЦЕПТИНА ВЪРХУ БОЛКОВАТА
ПЕРЦЕПЦИЯ ПРИ ОСТЪР И ХРОНИЧЕН
ИМОБИЛИЗАЦИОНЕН СТРЕС**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на образователната и
научна степен „Доктор“**

**Докторска програма
„Физиология на човека“**

**Научни ръководители
проф. д-р Галя Ставрева-Маринова, д.м.
проф. д-р Адриана Бочева, д.м. (†)**

**Плевен
2026**

Дисертационният труд съдържа 188 стандартни страници, включващ 2 таблици и 42 фигури.

Библиографският списък съдържа 573 литературни източника на латиница.

Във връзка с дисертационния труд са направени 5 пълнотекстови публикации и 19 научни съобщения и доклади на национални форуми.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за публична защита от разширен Катедрен съвет на катедра „Физиология и патофизиология“, факултет „Медицина“, при Медицински университет-Плевен, проведен на 29.10.2025 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 12.02.2026 г. от 13.00 часа в зала „Луи Пастър“, на Медицински университет - Плевен, съгласно правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет - Плевен и въз основа на Заповед на Ректора № 4432/25.11.2025 г. пред научно жури в състав:

Председател:

Проф. д-р Анелия Александрова Димитрова, д.м.

Членове:

Проф. д-р Маргарита Стефанова Великова, д.м.

Проф. д-р Юлия Георгиева Николова, д.м.

Проф. д-р Иванка Илиева Костадинова, д.м.

Доц. д-р Красимир Костов Гинев, д.м.

Официални рецензенти:

Проф. д-р Маргарита Стефанова Великова, д.м.

Проф. д-р Анелия Александрова Димитрова, д.м.

Материалите по защитата са публикувани на сайта на МУ-Плевен: <http://www.mu-pleven.bg/index.php/bg>

СЪДЪРЖАНИЕ

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ	5
ВЪВЕДЕНИЕ	6
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	7
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	8
I. In vivo методи	8
1. Ноцицептивни тестове.....	8
1.1. Метод с прилагане на механично дразнене - Paw pressure (PP) тест.....	8
1.2. Метод с прилагане на термично дразнене - Hot plate (HP) тест	9
2. Методи за предизвикване на стрес.....	10
2.1. Остър имобилизационен стрес.....	10
2.2. Хроничен имобилизационен стрес.....	10
II. Имунологични методи	11
III. Синтез на аналози на ноцицептин N/OFQ(1-13)NH ₂	11
IV. Статистически анализ.....	13
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	13
1. Аналгетични ефекти на N/OFQ(1-13)NH ₂ и аналози – [Orn ⁹]N/OFQ(1-13)NH ₂ , [Orn ⁹ ,Orn ¹³]N/OFQ(1-13)NH ₂ върху ноцицепцията, посредством тестове въвличащи механо- (PP) и терморекцепторите (HP) при:.....	13
1.1. интактни групи животни.....	13
1.2. животни, подложени на остър имобилизационен стрес.....	15
1.3. животни, подложени на хроничен имобилизационен стрес.....	17
1.4. Обсъждане.....	19
2. Влияние на NOP-селективния антагонист JTC-801 върху аналгетичните ефекти на ноцицептин N/OFQ(1-13)NH ₂ и аналози [Orn ⁹]N/OFQ(1-13)NH ₂ , [Orn ⁹ ,Orn ¹³]N/OFQ(1-13)NH ₂ при:.....	23
2.1. интактни групи животни.....	23
2.2. животни, подложени на остър имобилизационен стрес.....	24
2.3. животни, подложени на хроничен имобилизационен стрес.....	26
2.4. Обсъждане.....	28

3. Влияние на неселективния опиоиден рецепторен антагонист налоксон върху аналгетичните ефекти на ноцицептин N/OFQ(1-13)NH ₂ и аналози [Orn ⁹]N/OFQ(1- 13)NH ₂ , [Orn ⁹ ,Orn ¹³]N/OFQ(1-13)NH ₂ при:.....	35
3.1. животни, подложени на остър имобилизационен стрес.....	35
3.2. животни, подложени на хроничен имобилизационен стрес.....	37
3.3. Обсъждане.....	39
4. Влияние на азотноокисната система върху аналгетичните ефекти на N/OFQ(1- 13)NH ₂ и аналози – [Orn ⁹] и [Orn ⁹ ,Orn ¹³], чрез L-NAME (инхибитор на азотноокисната синтаза, NOS) и L-arginine (прекурсор на NO) при:.....	41
4.1. животни, подложени на остър имобилизационен стрес.....	41
4.2. животни, подложени на хроничен имобилизационен стрес.....	45
4.3. Обсъждане.....	49
5. Ефекти на N/OFQ(1-13)NH ₂ и аналози – [Orn ⁹] и [Orn ⁹ ,Orn ¹³] върху серумните нива на АСТН, кортизол и адреналин при остър и хроничен имобилизационен стрес.....	53
5.1. серумни нива на АСТН.....	53
5.2. серумни нива на кортизол.....	54
5.3. серумни нива на адреналин.....	55
5.4. Обсъждане.....	56
ИЗВОДИ.....	60
ПРИНОСИ.....	62
СПИСЪК НА ПРОЕКТИ, ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	63

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

ACTH	адренокортикотропен хормон
Arg	аргинин
ChIS	хроничен имобилизационен стрес
CRH	кортикотропин-освобождаващ хормон
HP	Hot plate test
HPA	хипоталамо-хипофизо-адренокортикална ос
i.p.	интраперитонеално въвеждане
iNOS	индуцируема NO синтаза
L-NAME	L-NG-Nitro-Arginine Methyl Ester
Lys	лизин
N/OFQ	ноцицептин/орфанин
Nal	налоксон
NMDA	N-метил-D-аспартат
nNOS	невроналната азотноокисна синтаза
NO	азотен оксид
NOP	ноцицептинов рецептор
NOS	азотноокисна синтаза
Orn	орнитин
PAG	periaqueductal gray
POMC	проопиомеланокортин
PP	Paw Pressure test
PVN	паравентрикуларно ядро
SAM	симпатоадреномедуларна система
SIA	стрес-индуцирана аналгезия

ВЪВЕДЕНИЕ

Регулацията на болковата перцепция при състояния на стрес представлява едно от най-сложните и актуални предизвикателства в съвременната невробиология и неврофармакология. Стресът представлява комплексен физиологичен и поведенчески отговор на организма към застрашаващи или нарушаващи хомеостазата стимули, активиращ мрежа от невронни, ендокринни и имунни механизми. В краткосрочен план този отговор е адаптивен и защитен, но при продължително въздействие може да доведе до дезадаптация, характеризираща се с повишена болкова чувствителност, емоционална нестабилност и нарушена неuropeптидна регулация.

Един от добре изследваните феномени, свързани със стресовата реакция, е стрес-индуцираната аналгезия (SIA) – временно понижение на болковата чувствителност в отговор на остри стресови стимули като имобилизация, крайни температури или социална изолация. Тази реакция се медира от множество невромодулаторни системи, сред които ключова роля играе ендогенната опиоидна система. Наред с нея обаче, значим научен интерес предизвиква и ноцицептиновата система, съставена от неuropeптида ноцицептин/орфанин FQ (N/OFQ) и неговия специфичен рецептор NOP.

N/OFQ е ендогенен неuropeптид с антиопиоиден профил, който структурно наподобява класическите опиоидни пептиди, но не взаимодейства с MOR, DOR или KOR рецепторите. Вместо това, той упражнява своето действие чрез селективна активация на NOP – G-протеин-свързан рецептор, който се характеризира с уникален физиологичен профил. Активацията на NOP потиска освобождаването на невротрансмитери и модулира болковата, поведенческата, емоционалната и ендокринната реактивност към стрес.

Експресиран в ключови мозъчни структури като хипоталамус, амигдала и *periaqueductal grey* (PAG), NOP участва в интеграцията между афективните и сензорни компоненти на болката и в балансирането на адаптивните и дезадаптивните отговори при остър и хроничен стрес. Специфичната контекст-зависима активност на тази система е особено интересна, докато при остър стрес N/OFQ може да прояви анксиолитични и антиноцицептивни ефекти, хроничният стрес води до нарушена рецепторна чувствителност, повишена експресия на препроноцицептин и засилена болкова сензитивност.

С оглед на тези характеристики, разработването на нови синтетични аналози на N/OFQ се очертава като перспективен фармакологичен подход. От особено значение са пептидните модификации [Orn⁹]N/OFQ(1–13)NH₂ и [Orn⁹, Orn¹³]N/OFQ(1–13)NH₂, при които аминокиселината лизин е заместена с орнитин в ключови позиции. Тези съединения демонстрират

повишена биостабилност и рецепторна селективност, като предлагат нови възможности за по-прецизна модулация на болката в условия на стрес.

Целта на настоящата дисертация е да се изследват ефектите на тези нови аналози на ноцицептина върху болковата перцепция при експериментални модели на остър и хроничен имобилизационен стрес, с фокус върху взаимодействието им с основни невромодулиращи системи: ноцицептинергична, опиоидна и азотноокисна. Получените резултати могат да допринесат за по-задълбочено разбиране на ролята на NOP-свързаните механизми в регулацията на болката и стреса, както и да очертаят перспективи за тяхното приложение като фармакологични стратегии при стрес-асоциирани болкови състояния.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия труд е да се изследват аналгетичните ефекти на нови аналози на ноцицептина – $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ и $[\text{Orn}^9, \text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ върху болковата перцепция, както и взаимодействието им с опиоидната, ноцицептиновата и азотноокисната системи при остър и хроничен имобилизационен стрес.

За изпълнението на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се изследват аналгетичните ефекти на $\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ и нови ноцицептинови аналози – $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ и $[\text{Orn}^9, \text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ върху ноцицепцията, посредством тестове въвличащи механо- и терmoreцепторите при:
 - 1.1. интактни групи животни;
 - 1.2. животни, подложени на остър имобилизационен стрес;
 - 1.3. животни, подложени на хроничен имобилизационен стрес.
2. Да се изследва влиянието на NOP-селективния антагонист JTC-801 върху аналгетичните ефекти на $\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ и аналози – $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, $[\text{Orn}^9, \text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ при:
 - 2.1. интактни групи животни;
 - 2.2. животни, подложени на остър имобилизационен стрес;
 - 2.3. животни, подложени на хроничен имобилизационен стрес.
3. Да се изследва влиянието на неселективния опиоиден рецепторен антагонист налоксон върху аналгетичните ефекти на ноцицептин $\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ и аналози – $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, $[\text{Orn}^9, \text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ при:
 - 3.1. интактни групи животни;
 - 3.2. животни, подложени на остър имобилизационен стрес;

3.3. животни, подложени на хроничен имобилизационен стрес.

4. Да се изследва влиянието на азотноокисната ситема върху аналгетичните ефекти на ноцицептин N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Orn⁹,Orn¹³]N/OFQ(1-13)NH₂, чрез L-NAME (инхибитор на азотноокисната синтаза NOS) и L-arginine (прекурсор на NO) при:

4.1. интактни групи животни;

4.2. животни, подложени на остър имобилизационен стрес;

4.3. животни, подложени на хроничен имобилизационен стрес.

5. Да се изследват ефектите на ноцицептин N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози [Orn⁹,Orn¹³]N/OFQ(1-13)NH₂, [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху серумните нива на АСТН, кортизол и адреналин при остър и хроничен имобилизационен стрес.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Експериментите бяха проведени върху 402 мъжки плъхове порода Wistar (180-200g), разпределени по 6 във всяка група и отглеждани в полипропиленови клетки, при нормални условия, със свободен достъп на вода и храна при температура 22 ± 2°C. Светлината бе с регулиран цикъл: 12 часа светло/12 часа тъмно. Опитите бяха проведени между 9.00 и 12.00 ч.

Проучването е извършено в съответствие с националните и международни изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни (Европейска директива 2010/63/EU) и е одобрено от Българската агенция по безопасност на храните (разрешително регистрационен № 239/16.09.2019 г.).

I. *In vivo* методи

1. Ноцицептивни тестове

1.1. Метод с прилагане на механично дразнене - paw pressure (PP) test - Randall-Selitto test

За оценка на механичната болкова чувствителност при експериментални животни бе използван метод с прилагане на механично дразнене – тест за натиск върху лапата (Paw Pressure test), известен още като тест на Randall-Selitto. Това е класически *in vivo* метод, чувствителен към аналгетици с периферно действие, който позволява количествено измерване на болковия праг при лабораторни животни.

В настоящото изследване бе използван аналгезиметър (Ugo Basile, Italy), чрез който се прилагаше постепенно увеличаващ се механичен

натиск върху задната лапа на плъха, поставена под заоблен метален накрайник с диаметър около 1 mm. Животното бе ръчно стабилизирано, така че да се сведе до минимум допълнителният стрес и да се осигури точност на измерването.

Измерването на болковия праг се извършваше чрез регистрация на характерна двигателна реакция – отдръпване на лапата, възникваща при достигане на прага на ноцицептивност. Натискът бе градуиран и се отчиташе в относителни единици съгласно скалата на апарата, като максималната приложима сила бе ограничена до 500 g за предотвратяване на увреждането на тъканите. Тестът позволява и отчитане на супраспинални реакции (вокализация), които биха могли да служат като допълнителен показател за болково усещане.



Фигура 1. Метод с прилагане на механично дразнене - Paw pressure test

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

За оценка на термичната болкова чувствителност бе приложен методът HP тест, който е утвърден поведенчески модел за изследване на централната ноцицептивна активност. Тестът бе проведен върху свободно подвижни лабораторни плъхове, като термичен стимул с температура $55 \pm 1^\circ\text{C}$ бе прилаган върху плантарната повърхност на лапите. Измерването на болковия праг се извършваше чрез регистрация на латентното време – интервалът от началото на термичната стимулация до появата на характерна реакция на животното (близане на лапите, скокове), сигнализираща възприемането на болката. Времето на реакция се отчиташе в секунди, като по-дългата латенция се интерпретира като повишен болков праг или наличие на аналгезия.

С цел предотвратяване на тъканно увреждане, беше приложено максимално време на експозиция (cut-off time), обикновено 30 секунди. Тестът бе проведен в контролирана среда, с минимални външни дразнители, като животните предварително бяха адаптирани към експерименталната обстановка. Измерванията се извършваха в няколко последователни сесии, позволяващи проследяване на динамиката на

ноцицептивния праг във времето и под влияние на експериментални интервенции.



Фигура 2. Метод с прилагане на термично дразнене - Hot plate тест

2. Методи за предизвикване на стрес

В настоящото изследване за предизвикване на психофизиологичен стрес при лабораторни плъхове бяха използвани два утвърдени модела на остър и хроничен имобилизационен стрес.

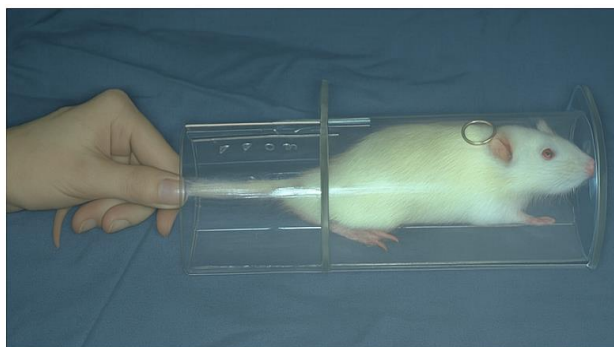
2.1. Остър имобилизационен стрес

При острия имобилизационен стрес животните се поставяха еднократно за 1 час в прозрачни пластмасови цилиндри с отвори за вентилация, които ограничават движенията им без да причиняват физическо увреждане.

2.2. Хроничен имобилизационен стрес

При хроничния имобилизационен стрес животните се поставяха ежедневно за 3 часа в същите цилиндри, в продължение на 4 последователни дни. Този протокол е адаптиран от модели, използвани за индуциране на депресивноподобно поведение и поведенчески промени, свързани с продължителна експозиция на стрес.

И в двата модела се използваха индивидуални цилиндри, съобразени с размера на животното, с достатъчно отвори за дишане и без възможност за движение, като се спазваха етични стандарти за минимизиране на дискомфорта. Животните бяха адаптирани към експерименталната среда преди началото на процедурите, а контролни групи бяха държани в идентични условия без експозиция на стрес.



Фигура 3. Модел на имобилизационен стрес

II. Имунологични методи

За количествено определяне на концентрацията на адренотропния хормон (ACTH), кортизол и адреналин в серумни проби от плъхове бе използван ELISA анализ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Концентрацията на ACTH бе измерена с помощта на специализиран ELISA kit за плъхове (MyBioSource, San Diego, CA, USA), като резултатите бяха отчетени в pg/ml. Кортизолът бе определен чрез аналогичен ELISA kit от същия производител, като стойностите бяха отчетени в ng/ml. Концентрацията на адреналин (епинефрин) също бе измерена с ELISA kit (MyBioSource, San Diego, CA, USA) и представена в ng/ml. Методът бе проведен съгласно инструкциите на производителя, осигурявайки висока чувствителност и специфичност за всяко от изследваните вещества.

III. Синтез на аналози на ноцицептин $N/OFQ(1-13)NH_2$

Аналозите на ноцицептин $N/OFQ(1-13)NH_2$ – $[Orn^9]N/OFQ(1-13)NH_2$ и $[Orn^9, Orn^{13}]N/OFQ(1-13)NH_2$ бяха синтезирани от екипа на проф. д-р инж. Емилия Найденова, дхн, от катедра „Органична химия“, Факултет по химични технологии, Химикотехнологичен и металургичен университет – София.

Синтезът бе извършен по метода на твърдофазовата пептидна синтеза (Solid Phase Peptide Synthesis), с използване на Fmoc-стратегия. В тези модифицирани аналози аминокиселината лизин (Lys) в позиции 9 и/или 13 бе заместена с орнитин (Orn), с цел изследване на влиянието на тази структурна промяна върху аналгетичната активност на пептида и взаимодействието му с опиоидната, ноцицептиновата и азотноокисната системи при остър и хроничен имобилизационен стрес.

Получени бяха следните нови фрагментни аналози на $N/OFQ(1-13)NH_2$:

- [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂:H-Phe¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Thr⁵-Gly⁶-Ala⁷-Arg⁸-Orn⁹-Ser¹⁰-Ala¹¹-Arg¹²-Lys¹³-NH₂
- [Orn⁹,Orn¹³]N/OFQ(1-13)NH₂:H-Phe¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Thr⁵-Gly⁶-Ala⁷-Arg⁸-Orn⁹-Ser¹⁰-Ala¹¹-Arg¹²-Orn¹³-NH₂

Експериментални протоколи

За ноцицептивните методи: Животните бяха разпределени в групи по 6. Всички вещества бяха разтворени в 0.9% разтвор на NaCl и въведени интраперитонеално (i.p.). N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³], всичките в доза 10 µg/kg бяха въведени: 1.) в интактни животни; 2.) в интактни животни и 10 мин. след JTC-801 (N-(4-amino-2-methylquinolin-6-yl)-2-(4-ethylphenoxy)methyl benzamide monohydrochloride) в доза (0,5 mg/kg); 3.) в интактни животни и 20 мин. след Naloxone hydrochloride dehydrate (Nal, 1 mg/kg), L-NG-Nitro-Arginine Methyl Ester (L-NAME) в доза 10 mg/kg или L-Arginine (L-Arg) в доза 1 mg/kg; 4.) веднага след стрес процедурата; 5.) след стрес и 10 мин. след JTC-801 (0,5 mg/kg); 6.) след стрес и 20 мин. след Naloxone hydrochloride dehydrate (1mg/kg), L-NAME (10 mg/kg) или L-Arginine (1 mg/kg). Използваните субстанции бяха закупени от Sigma-Aldrich (Merck, Германия).

Контролната група бе група от интактни животни инжектирана с физиологичен разтвор 1 ml/kg. Ноцицептивните измервания започваха веднага след стрес или 10 мин. след инжектиране на пептидите.

За ELISA анализ: Животните бяха разделени в 9 групи по (n = 6). Контролната група бе група от интактни животни. Две от групите бяха подложени само на един от двата модела на стрес – остър (1hIS) или хроничен имобилизационен стрес (CIS), инжектирани само с физиологичен разтвор. Останалите групи бяха подложени на един от двата вида стрес (1hIS или CIS) и инжектирани с ноцицептин или с един от двата аналози (всичките в доза 10 µg/kg, i.p.).

За провеждане на ELISA анализа за определяне на серумните нива на АСТН, кортизол и адреналин се извърши еднократно вземане на кръвна проба чрез пункция на сублингвалната вена. Животните бяха подложени на анестезия с кетамин (90 mg/kg) i.p. Пункцията на сублингвалната вена се извършваше със стерилна игла (27-30G), като се събираше ≈1 ml кръв в епруветка без антикоагулант. Пробите се оставяха да се съсирят при стайна температура за 30-45 минути, след което се центрофугираха на 3000 rpm за 10-15 минути. Полученият серум се прехвърляше в чисти епруветки и се съхраняваше при -20°C. След размразяване, серумните проби се използваха за количествено определяне на хормоналните нива чрез конкурентни ELISA методи съгласно инструкциите на съответните китове (АСТН – MBS2700345, кортизол – MBS701698, адреналин – MBS732836, MyBioSource, San Diego, CA, USA).

IV. Статистически анализ

Количествените променливи бяха описани чрез изчисляване на средна аритметична стойност (Mean) и стандартна грешка (SEM), с цел характеризиране на централната тенденция и вариабилността на данните. За проверка на хипотезата за наличие на различия между групите бе приложен еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA). При установяване на статистически значими различия бе използван *post hoc* тест на Bonferroni, който позволява извършване на множествени сравнения между групите. Нивото на статистическа значимост бе предварително фиксирано на $p < 0.05$.

С цел по-ясно илюстриране на различията между изследваните групи, резултатите бяха визуализирани чрез стълбовидни диаграми, представящи средни стойности (Mean), 95% доверителни интервали (95% CI) и ниво на статистическа значимост (*p*-value).

Статистическата обработка на данните бе извършена със специализиран софтуер IBM SPSS Statistics, версия 26, а за графичното представяне на резултатите бе използван Microsoft Excel 2019. Получените резултати са подробно представени в раздел „Резултати“.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

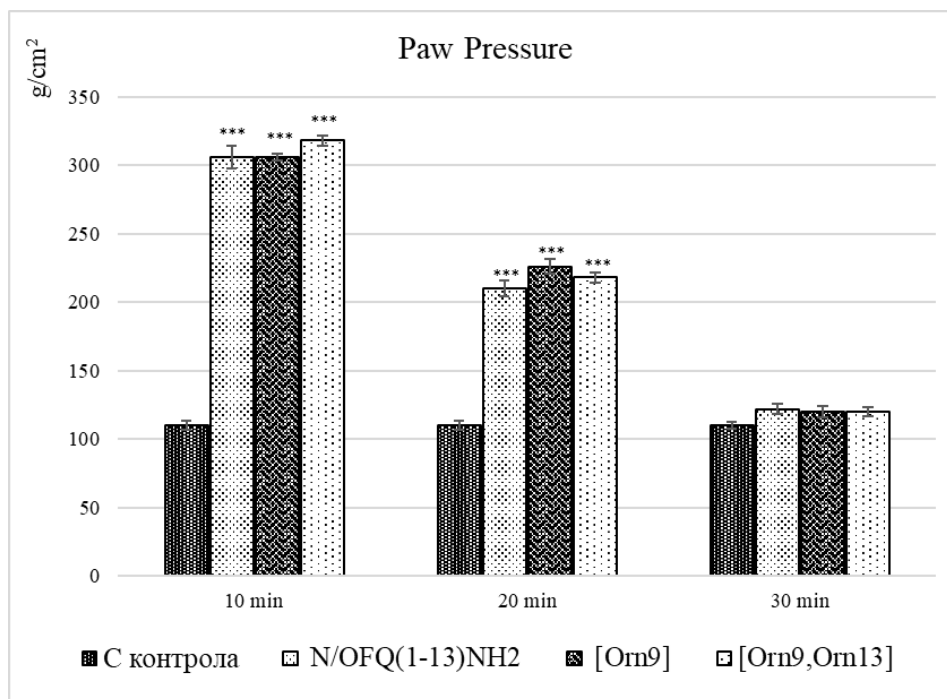
1. Аналгетични ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] върху ноцицепцията, посредством тестове въвличащи механо- (PP) и терморепторите (HP) при:

1.1. интактни групи животни

Paw Pressure test

В PP теста N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] статистически достоверно повишиха болковия праг на 10-та и 20-та минута в сравнение с контролната група ($p < 0.001$). На 10-та минута се наблюдават най-високи стойности на болковия праг: [Orn⁹,Orn¹³] ($318 \text{ g/cm}^2 \pm 3.742$), [Orn⁹] и N/OFQ(1-13)NH₂ ($306 \text{ g/cm}^2 \pm 2.449$ и $306 \text{ g/cm}^2 \pm 8.124$, съответно). На 20-та минута се наблюдава статистическа разлика спрямо контролата ($p < 0.001$) при всички пептиди: N/OFQ(1-13)NH₂ ($210 \text{ g/cm}^2 \pm 5.477$), [Orn⁹] ($226 \text{ g/cm}^2 \pm 5.099$) и [Orn⁹,Orn¹³] ($218 \text{ g/cm}^2 \pm 3.742$).

На 30-та минута се наблюдава понижаване на болковия праг при всички пептиди, като стойностите са съизмерими с тези на контролната група, което показва затихване на аналгетичния ефект (фиг. 4).



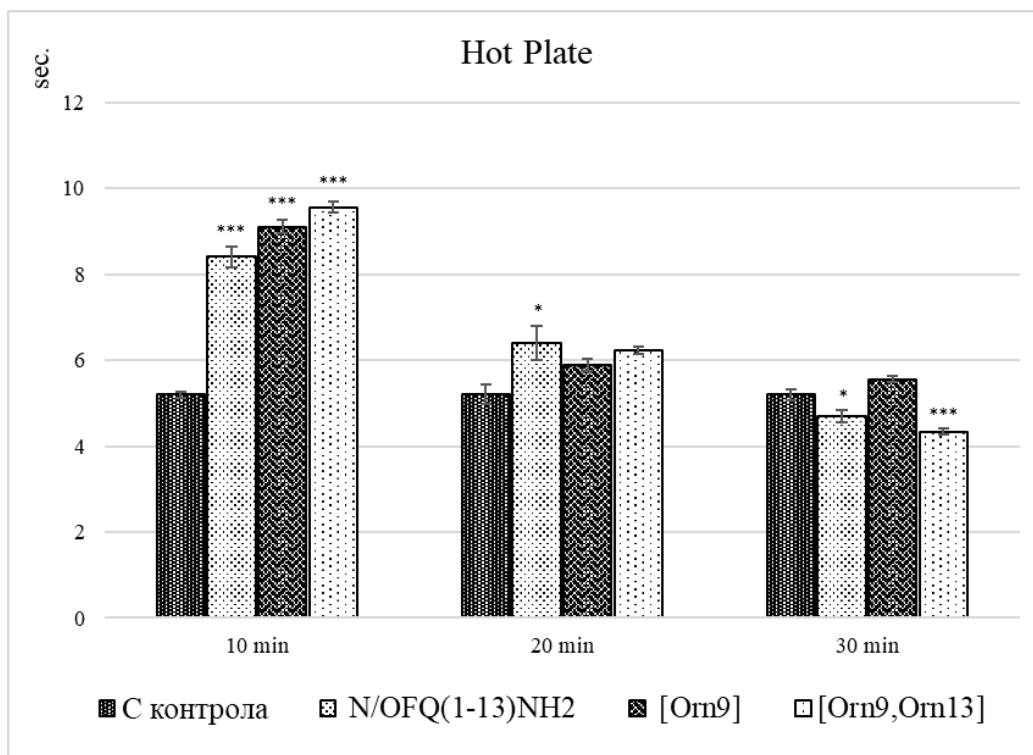
Фигура 4. Ефекти на $N/OFQ(1-13)NH_2$ и аналози – $[Orn^9]$ и $[Orn^9, Orn^{13}]$ всичките в доза ($10 \mu g/kg$, i.p.) върху болковия праг при интактни животни. Данните са представени като средни стойности $\pm S.E.M.$; *** $P < 0.001$, спрямо контролата.

Hot Plate test

На 10-та минута от теста се наблюдава статистически значимо удължено латентното време при всички експериментални групи спрямо контролата ($p < 0.001$). Отчетените стойности са както следва:

- $N/OFQ(1-13)NH_2$: 8.4 ± 0.24 s
- $[Orn^9]$: 9.1 ± 0.15 s
- $[Orn^9, Orn^{13}]$: 9.56 ± 0.12 s

На 20-та минута $N/OFQ(1-13)NH_2$ статистически значимо удължава латентно време спрямо контролната група ($p < 0.05$). При $[Orn^9]$ и $[Orn^9, Orn^{13}]$ се наблюдава удължаване, но без статистически значима разлика. На 30-та минута се наблюдава статистически значимо скъсяване на латентното време спрямо контролата ($p < 0.05$) при $N/OFQ(1-13)NH_2$ и ($p < 0.001$) при $[Orn^9, Orn^{13}]$. При $[Orn^9]$ латентното време бе съизмеримо с това на контролната група (фиг. 5).



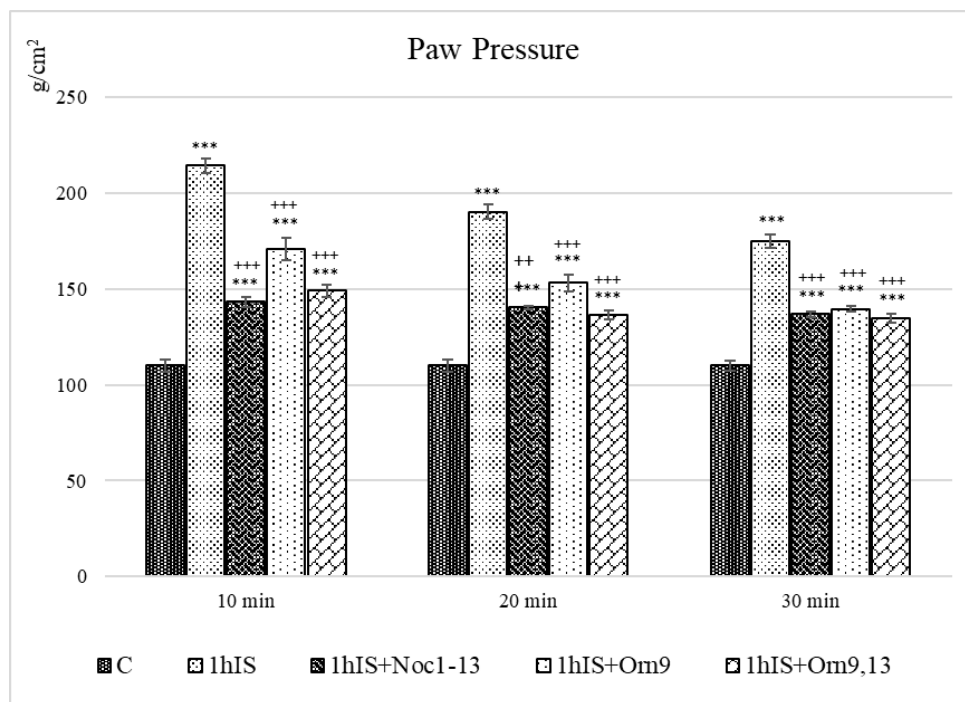
Фигура 5. Ефекти на $N/OFQ(1-13)NH_2$ и аналози – $[Orn^9]$ и $[Orn^9,Orn^{13}]$ ($10 \mu g/kg$, i.p.) върху HP-латентността при интактни животни. Данните са представени като средни стойности $\pm$ S.E.M.; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, спрямо контролата

1.2. Аналгетични ефекти на $N/OFQ(1-13)NH_2$ и аналози – $[Orn^9]$ и $[Orn^9,Orn^{13}]$ върху ноцицепцията, посредством тестове въвличащи механо- (PP) и терморецепторите (HP) при животни, подложени на остър имобилизационен стрес.

Paw Pressure test

Резултатите от PP теста показаха че, групата подложена на остър имобилизационен стрес (1hIS) статистически значимо повишава болковия праг, спрямо контролната група за целия период на изследването ($p < 0.001$).

$N/OFQ(1-13)NH_2$ и аналозите след стреса статистически значимо понижиха болковия праг спрямо 1hIS ($p < 0.001$), за целия изследван период. Спрямо контролната група се наблюдава значимо повишаване на болковия праг ($p < 0.001$) (фиг. 6).



Фигура 6. Ефекти на $N/OFQ(1-13)NH_2$ и аналози – $[Orn^9]$ и $[Orn^9, Orn^{13}]$ ($10 \mu g/kg$, i.p.) върху болковия праг след 1hIS. Данните са представени като средни стойности $\pm S.E.M.$; *** $p < 0.01$, спрямо контролата; +++ $p < 0.001$ спрямо 1hIS.

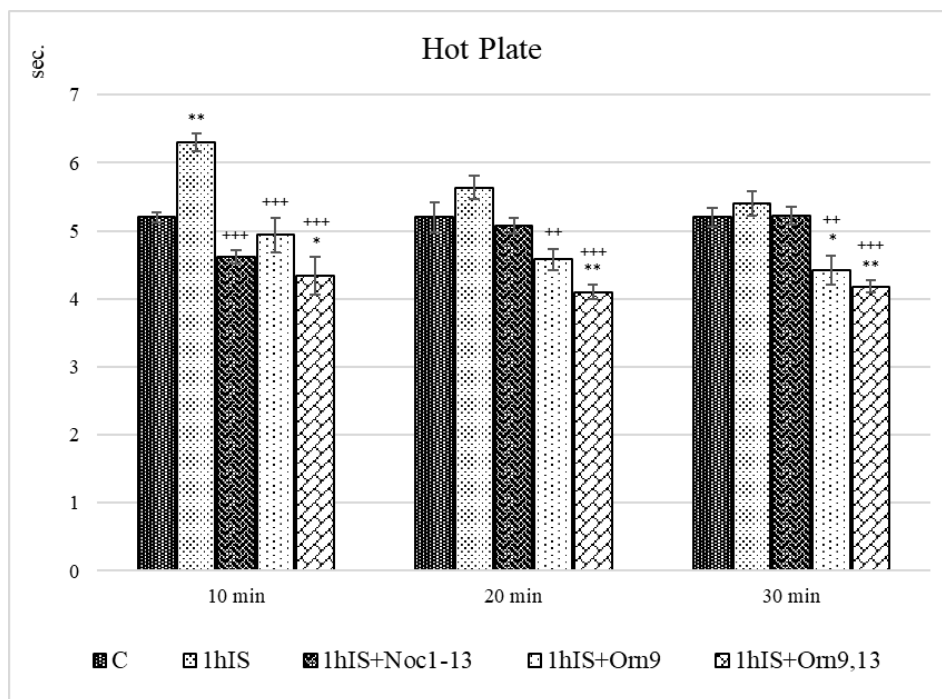
Hot Plate test

Групата животни, подложена на 1hIS статистически значимо удължава латентното време на 10-та минута спрямо контролната група ($p < 0.01$).

Въвеждането на $N/OFQ(1-13)NH_2$ след стреса води до статистически значимо скъсяване на латентното време на 10-та минута спрямо 1hIS ($p < 0.001$).

Аналозите $[Orn^9]$ и $[Orn^9, Orn^{13}]$ след стреса статистически значимо скъсяват латентното време спрямо 1hIS за целия изследван период ($p < 0.01$; $p < 0.001$).

При $[Orn^9, Orn^{13}]$ се наблюдава статистически значимо скъсяване на латентното време спрямо контролната група ($p < 0.05$ на 10-та мин.; $p < 0.01$ на 20-та и 30-та мин.), а при $[Orn^9]$ на 30-та минута ($p < 0.05$) (фиг. 7).



Фигура 7. Ефекти на $N/OFQ(1-13)NH_2$ и аналози – $[Orn^9]$ и $[Orn^9, Orn^{13}]$ ($10 \mu g/kg$, i.p.) върху HP-латентността след 1hIS. Данните са представени като средни стойности $\pm S.E.M$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, спрямо контролата; ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$ спрямо 1hIS.

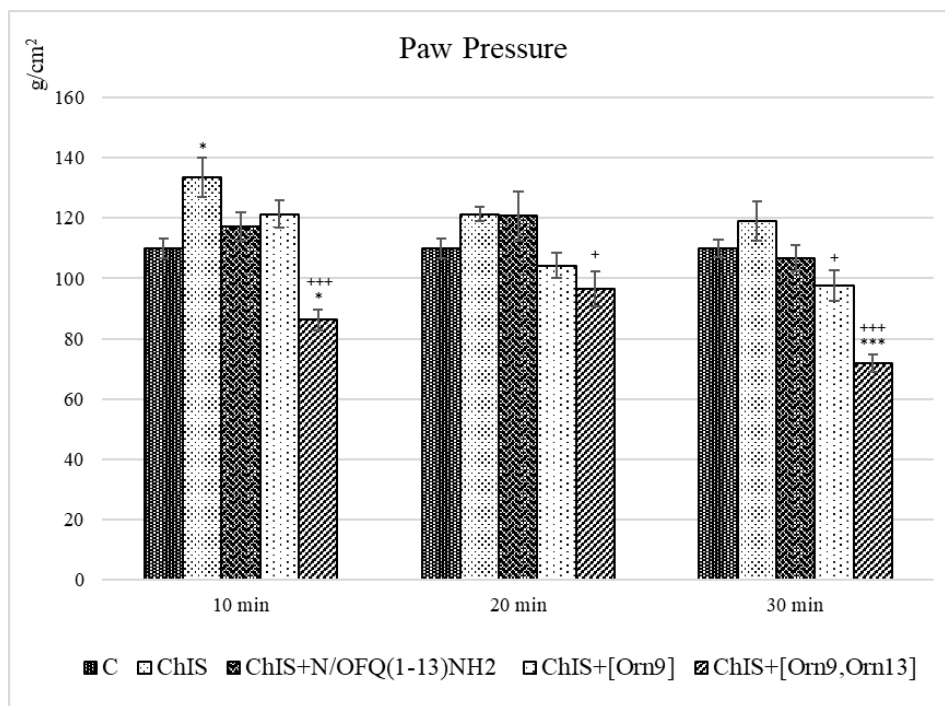
1.3. Аналгетични ефекти на $N/OFQ(1-13)NH_2$ и аналози – $[Orn^9]$ и $[Orn^9, Orn^{13}]$ върху ноцицепцията, посредством тестове въвличащи механо- (PP) и терморепторите (HP) при животни, подложени на хроничен имобилизационен стрес (ChIS).

Paw Pressure test

Резултатите показаха, че животните подложени на ChIS статистически значимо повишават болковия праг спрямо контролната група на 10-та минута ($p < 0.05$).

$N/OFQ(1-13)NH_2$ след стреса понижава болковия праг на 10-та и 30-та минута, но без статистическа значима разлика спрямо ChIS, а на 20-та мин. отговорът е съизмерим с този на животните, подложени на ChIS.

Аналогът $[Orn^9]$ статистически значимо понижава болковия праг на 30-та минута спрямо ChIS ($p < 0.05$), а $[Orn^9, Orn^{13}]$ за целия период на изследването: на 10-та ($p < 0.001$), на 20-та ($p < 0.05$) и на 30-та минута ($p < 0.001$) спрямо ChIS и спрямо контролната група ($p < 0.05$) на 10-та и ($p < 0.001$) на 30-та минута (фиг. 8).



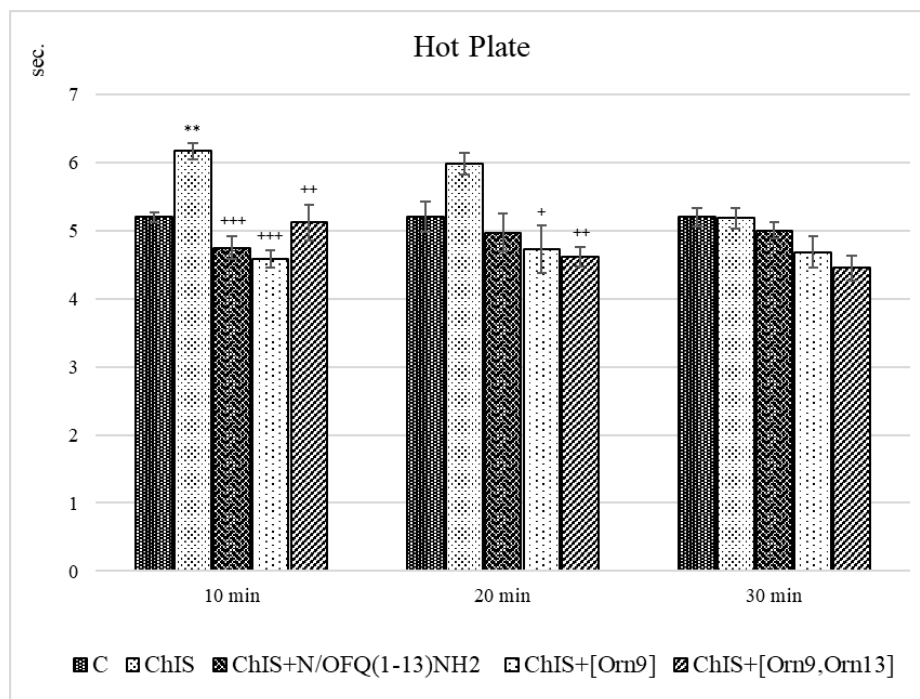
Фигура 8. Ефекти на $N/OFQ(1-13)NH_2$ и аналози – $[Orn^9]$ и $[Orn^9, Orn^{13}]$ ($10 \mu g/kg$, i.p.) върху болковия праг след ChIS. Данните са представени като средни стойности $\pm$ S.E.M; *** $p < 0.001$ спрямо контролата; + $p < 0.05$; +++ $p < 0.001$, спрямо ChIS.

Hot Plate тест

Резултатите показват, че ChIS статистически значимо удължава латентно време спрямо контролната група на 10-та минута ($p < 0.01$). На 20-та минута се наблюдава удължено, а на 30-та минута съизмеримо с контролата латентното време.

При приложението на $N/OFQ(1-13)NH_2$ и аналозите непосредствено след стреса се наблюдава статистически значимо скъсено латентното време на 10-та и 20-та минута спрямо ChIS групата:

- ChIS+N/OFQ(1-13)NH₂ на 10-та минута ($p < 0.01$);
- $[Orn^9]$ на 10-та ($p < 0.001$) и 20-та минута ($p < 0.05$);
- $[Orn^9, Orn^{13}]$ на 10-та и 20-та минута ($p < 0.01$) (фиг. 9).



Фигура 9. Ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] (10 µg/kg, i.p.) върху НР-латентността след ChIS. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M; ***p*<0.01 спрямо контролата, +*p*<0.05; ++*p*<0.01; +++*p*<0.001, спрямо ChIS.

1.4. Обсъждане

В настоящото изследване бе оценен аналгетичният ефект на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите структурни аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] при интактни животни и при животни подложени на остър и хроничен имобилизационен стрес. Пептидите бяха приложени i.p. в доза 10 µg/kg, като болковата чувствителност бе оценена чрез два теста: РР за механична ноцицепция и НР за термична ноцицепция.

- Резултатите от РР теста показват, че всички изследвани пептиди статистически значимо повишават болковия праг на 10-та и 20-та минута (*p*<0.001), което свидетелства за изразен аналгетичен ефект при механична стимулация. Най-високи стойности се наблюдават на 10-та минута, като [Orn⁹,Orn¹³] показва най-силен ефект. Това предполага, че двойната орнитинова модификация може да повиши взаимодействието с NOP рецептора и да подобри стабилността на пептида.

Между самите пептиди не се установиха статистически значими различия (*p*>0.05), което показва, че тяхната аналгетична активност е сравнима по сила и продължителност в рамките на теста. На 30-та минута се наблюдава затихване на ефекта, като стойностите се доближават до тези на контролната група (фиг. 4), което е в съответствие с краткотрайния характер на аналгезията, описан при NOP агонисти.

В НР теста се наблюдава статистически значимо удължаване на латентното време на 10-та минута при всички пептиди ($p < 0.001$), което потвърждава аналгетичния им ефект при термична стимулация. На 20-та минута ефектът отслабва, като само N/OFQ(1-13)NH₂ запазва статистическа значима разлика ($p < 0.05$), спрямо контролата. На 30-та минута се наблюдава статистически значимо скъсяване на латентното време ($p < 0.05$), спрямо контролата при N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹,Orn¹³], докато при [Orn⁹] стойностите са съизмерими с контролната група (фиг. 5).

Тези резултати съответстват на описаната двойнствена роля на N/OFQ–NOP системата, която може да проявява както антиноцицептивни, така и проноцицептивни ефекти в зависимост от дозата, локализацията и типа на болковия стимул. Хипералгезията на 30-та минута вероятно се дължи на рецепторна десенситизация или компенсаторна активация на проноцицептивни механизми.

Разликите в резултатите между РР и НР тестовете могат да бъдат обяснени с техните различни физиологични основи. РР тестът оценява реакцията към механични стимули и е по-чувствителен към периферните механизми на аналгезия. Аналгетичният ефект наблюдаван в този тест вероятно се дължи на периферната активация на NOP рецепторите, която води до инхибиране на освобождаването на медиатори, като субстанция Р, глутамат и GABA от пресинаптичните окончания. Това намалява възбудимостта на ноцицептивните пътища и води до повишаване на болковия праг. От друга страна, НР тестът измерва реакцията към термични стимули и отразява предимно централната интеграция на болковите сигнали. Ефектите наблюдавани в този тест, вероятно се медираат от централни структури като PAG и таламуса, които участват в интеграцията и модулацията на ноцицептивната информация чрез низходящи инхибиторни механизми. Тази диференцирана чувствителност предполага, че наблюдаваните ефекти на пептидите се медираат от различни нива на ноцицептивната система в зависимост от вида на използвания експериментален модел. Допълнително структурните модификации на аналозите в позиции 9 и 13 могат да повлияят на рецепторната селективност, стабилността и продължителността на ефекта. Това би обяснило различията в времевата динамика на аналгезията и появата на хипералгезия при N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹,Orn¹³] в НР теста.

- Стресът представлява комплексен физиологичен и поведенчески отговор на организма към външни или вътрешни въздействия, който включва активация на НРА, автономната нервна система и редица невротрансмитерни системи. Един от добре документираните феномени, свързани с острия стрес, е стрес-индуцираната аналгезия (SIA) – временно понижаване на болковата чувствителност, което се счита за адаптивен механизъм, подпомагащ оцеляването в условия на опасност или натоварване.

Резултатите от РР теста показаха статистически значимо повишаване на болковия праг при животни, подложени на остър стрес, спрямо контролната група ($p < 0.001$). На 10-та минута прагът се увеличава с 94.8%, на 20-та с 73.0%, а на 30-та с 59.1% спрямо контролата (фиг. 6). Резултатите потвърждават наличието на SIA и са в съответствие с литературни данни, според които острият стрес активира ендогенни антиноцицептивни механизми.

В НР теста се наблюдава статистически значимо удължаване на латентното време на 10-та минута спрямо контролната група ($p < 0.01$), което потвърждава SIA (фиг.7). Постепенното скъсяване на латентното време на 20-та и 30-та минута при 1hIS групата показва, че ефектът на SIA е краткотраен.

В РР теста ноцицептин и аналозите след 1hIS статистически значимо понижават болковия праг ($p < 0.001$) спрямо групата, подложена на стрес и статистически значимо го повишават ($p < 0.001$) спрямо контролната група за целия изследван период, което показва, че пептидите потискат SIA, като [Orn⁹] показва по-слаб ефект на 10-та минута (фиг.6). Тези резултати са в подкрепа на литературни данни, според които NOP агонистите модулират, но не напълно потискат ендогенната аналгезия.

В НР теста приложението на пептидите след стреса води до статистически значимо скъсяване на латентното време спрямо 1hIS групата ($p < 0.001$) на 10-та минута, както и спрямо контролната група ($p < 0.05$) при [Orn⁹, Orn¹³]. На 20-та и 30-та минута от теста се наблюдава статистически значимо скъсяване на латентното време спрямо 1hIS ($p < 0.01$) при [Orn⁹] и ($p < 0.001$) при [Orn⁹, Orn¹³], както и спрямо контролната група ($p < 0.01$) при [Orn⁹, Orn¹³] на 20-та и 30-та минута и ($p < 0.05$) при [Orn⁹] на 30-та минута (фиг.7). Резултатите от НР теста потвърждават, че ноцицептин и аналозите потискат SIA. Наблюдаваната хипералгезия е показател за проноцицептивна активност на пептидите, особено изразена при [Orn⁹] и [Orn⁹, Orn¹³].

При сравнителният анализ на резултатите от РР и НР тестовите се установява, че проноцицептивният ефект на пептидите е по-силно изразен при термична стимулация. [Orn⁹, Orn¹³] статистически значимо скъсява латентното време, както спрямо 1hIS, така и спрямо контролната група за целия период на изследването (фиг. 6 и 7). Наблюдаваните ефекти са в съответствие с концепцията за модална селективност на SIA и подчертават взаимодействието между стреса, болката и неuropeптидната регулация.

- Резултатите от РР теста показаха, че животните подложени на ChIS статистически значимо повишават болковия праг на 10-та минута спрямо контролната група ($p < 0.05$), което потвърждава наличието на SIA описана при хронични модели на стрес (фиг. 8). Подобни ефекти се наблюдават и в НР теста, където ChIS статистически значимо удължава

латентното време на 10-та минута ($p < 0.01$), което потвърждава антиноцицептивния ефект на стреса (фиг. 9).

При приложението на N/OFQ(1-13)NH₂ след стреса се наблюдава понижение на болковия праг спрямо ChIS на 10-та и на 30-та минута, което показва че N/OFQ(1-13)NH₂ понижава SIA. В HP теста N/OFQ(1-13)NH₂ статистически значимо скъсява латентното време спрямо ChIS на 10-та минута ($p < 0.01$). Спрямо контролната група латентното време е сравнително по-кратко, което показва че пептидът напълно потиска SIA, като индуцира хипералгезия (фиг. 8 и 9).

Аналогът [Orn⁹] статистически значимо понижава болковия праг на 30-та минута спрямо ChIS ($p < 0.05$), като потиска аналгезията индуцирана от стреса. На 20-та и 30-та минута от PP теста болковият праг е сравнително понижен спрямо контролната група, което свидетелства за проноцицептивен ефект на пептида. В HP теста се наблюдава статистически значимо скъсяване на латентното време на 10-та минута ($p < 0.001$) и 20-та минута ($p < 0.05$) спрямо ChIS. Стойностите на латентното време при [Orn⁹] са сравнително по-ниски спрямо контролната група, което потвърждава проноцицептивния ефект на аналога при хроничен стрес (фиг. 8 и 9).

Най-силен проноцицептивен ефект в PP теста показва [Orn⁹, Orn¹³], като статистически значимо понижава болковия праг спрямо ChIS за целия период на изследването. Статистически значима разлика в болковия праг се наблюдава и спрямо контролната група на 10-та ($p < 0.05$) и 30-та минута ($p < 0.001$). В HP теста [Orn⁹, Orn¹³] статистически значимо скъсява латентното време на 10-та и 20-та минута ($p < 0.01$) спрямо ChIS групата (фиг. 8 и 9).

Резултатите показват, че ноцицептин и аналозите потискат аналгезията индуцирана от ChIS, като проноцицептивния ефект е по-изразен при [Orn⁹] и [Orn⁹, Orn¹³].

Хроничният стрес може да предизвика десенситизация на NOP рецепторите, водеща до намалена чувствителност към ноцицептиновите лиганди, вероятно чрез промяна в тяхната експресия или конформационно състояние и чрез повишена активност на антагонистични невромедиаторни системи като CRH и глутамат. В резултат N/OFQ/NOP системата може да модулира или дори да реверсира ефектите на ендогенната аналгезия, което води до динамична регулация на болковата чувствителност в зависимост от неврохимичната среда.

При хроничен стрес нарушената регулация на NOP рецепторите и тяхното взаимодействие с други невромодулиращи системи може да обясни проноцицептивните ефекти на пептидите и наблюдаваната хипералгезия както при механични, така и при термични стимули.

2. Влияние на NOP-селективния антагонист JTC-801 върху аналгетичните ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] при:

2.1. интактни групи животни

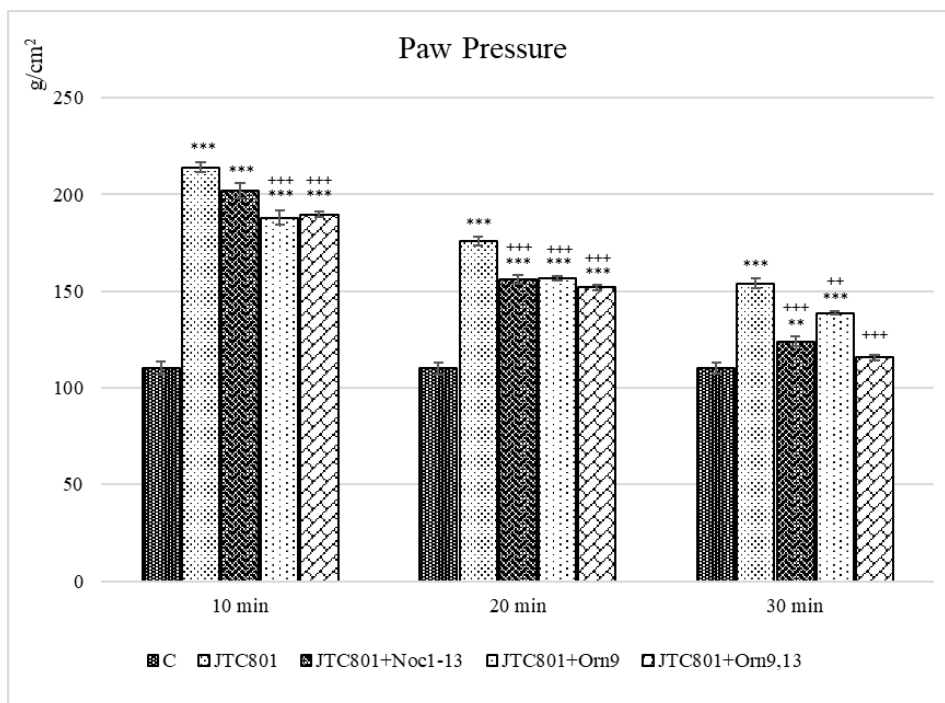
Paw Prssure тест

Самостоятелното приложение на JTC-801 статистически значимо повишава болковия праг за целия период на изследването, спрямо контролната група ($p < 0.001$).

При съвместното приложение на JTC-801 с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] се наблюдава статистически значимо понижаване на болковия праг спрямо JTC-801 за целия изследван период ($p < 0.01$; $p < 0.001$).

На 10-та минута [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] статистически значимо понижиха болковия праг спрямо JTC-801 ($p < 0.01$). При N/OFQ(1-13)NH₂ болковия праг също се понижва, но без статистическа разлика спрямо JTC-801. На 20-та и 30-та минута ноцицептин и аналозите статистически значимо понижиха болковия праг спрямо JTC-801 ($p < 0.01$; $p < 0.001$).

В сравнение с контролната група всички пептиди показаха статистически значимо по-висок болков праг ($p < 0.001$) за целия период на изследването (фиг. 10).



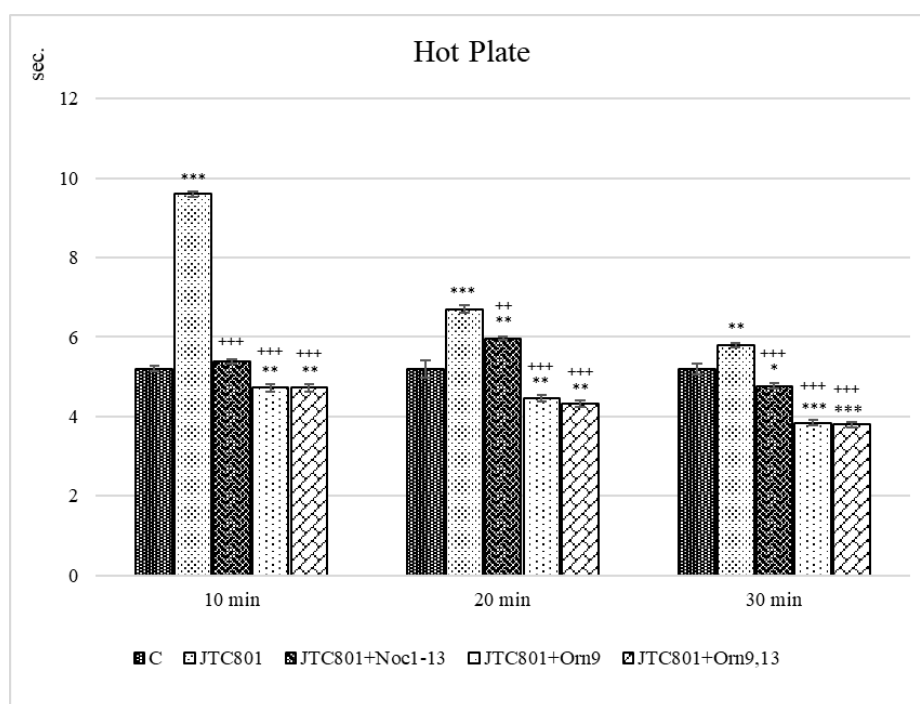
Фигура 10. Ефекти на JTC-801 при съвместното въвеждане с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] върху болковия праг при интактни животни. Данните са представени като средни стойности $\pm$ S.E.M.; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, спрямо контролата, + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$, спрямо JTC-801.

Hot Plate тест

Самостоятелно въведен JTC-801 статистически значимо удължава латентното време спрямо контролата на 10-та, 20-та и 30-минута ($p < 0.001$, 9,6 sec.; $p < 0.001$, 6,7 sec.; $p < 0.01$, 5,8 sec., съответно).

При съвместното въвеждане на JTC-801 с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] се наблюдава статистически значимо скъсяване на латентното време спрямо JTC-801 за целия период ($p < 0.001$, $p < 0.01$).

При [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] се наблюдава статистически значимо скъсяване на латентното време спрямо контролната група на 10-та, 20-та мин. ($p < 0.01$) и на 30-та минута ($p < 0.001$). N/OFQ(1-13)NH₂ статистически значимо скъсява латентното време на 30-та минута ($p < 0.05$) (фиг. 11).



Фигура 11. Ефекти на JTC-801 при съвместното въвеждане с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] върху HP латентността при интактни животни. Данните са представени като средни стойности $\pm$ S.E.M.; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, спрямо контролата, + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$, спрямо JTC-801.

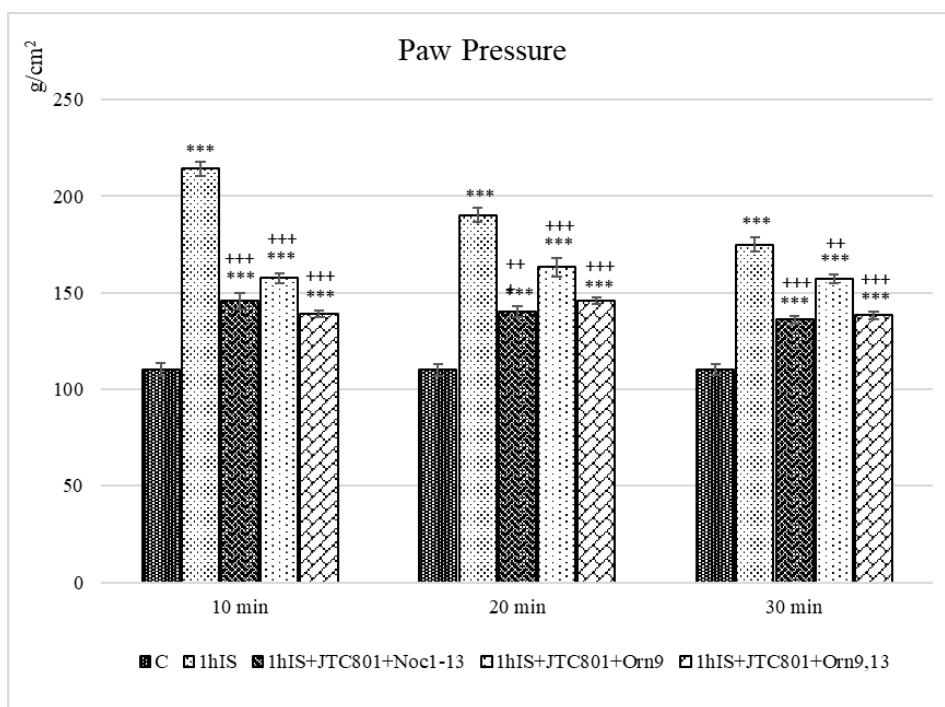
2.2. Влияние на NOP-селективния антагонист JTC-801 върху аналгетичните ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] при животни, подложени на 1hIS.

Paw Pressure тест

Групата подложена на 1hIS статистически значимо повишава прага на болката, спрямо контролната група ($p < 0.001$) за целия период на

изследване: 10-та минута (214.33 g/cm² / 110), 20-та минута (190.33 g/cm²/110) и 30-та минута (175 g/cm²/110).

При съвместното въвеждане на JTC-801 с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите след стреса се наблюдава статистически значимо понижаване на прага на болката, спрямо 1hIS (p<0.01; p<0.001), а спрямо контролната група статистически значимо повишаване (p<0.001) за целия изследван период (фиг. 12).



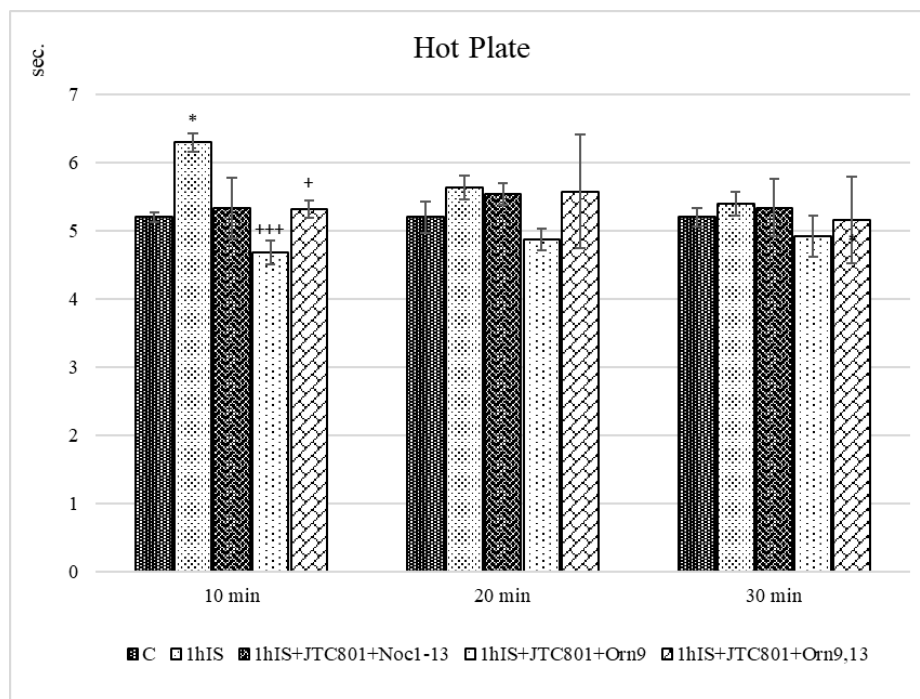
Фигура 12. Ефекти от съвместното приложение на JTC-801 (0.5 mg/kg, i.p.) с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] (10 µg/kg, i.p.) върху болковия праг след 1hIS. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.; ***p<0.001, спрямо контролата, +p<0.05; ++p<0.01; +++p<0.001 спрямо 1hIS.

Hot Plate test

Група подложена на 1hIS статистически значимо удължава латентното време спрямо контролата само на 10-та минута (p<0.05).

При съвместното въвеждане на JTC-801 с ноцицептин и аналозите след стреса се наблюдава статистически значимо скъсено латентно време (p<0.001) за [Orn⁹] и (p<0.05) за [Orn⁹,Orn¹³] спрямо 1hIS на 10-та минута.

На 20-та и 30-та минута не се наблюдават статистически значими разлики между групите (фиг. 13).



Фигура 13. Ефекти от съвместното приложение на JTC-801 (0.5 mg/kg, i.p.) с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] (10 µg/kg, i.p.) върху HP-латентността след 1hIS. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.; **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001, спрямо контролата, +*p*<0.05; ++*p*<0.01; +++*p*<0.001 спрямо 1hIS.

2.3. Изучаване влиянието на NOP-селективния антагонист JTC-801 върху аналгетичните ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] при животни, подложени ChIS.

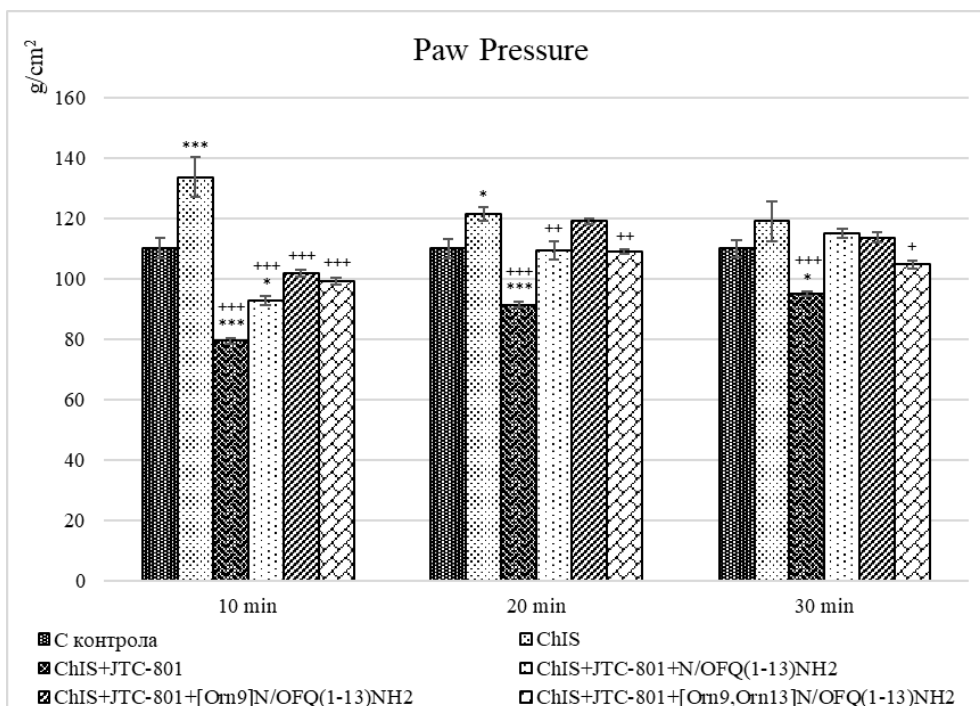
Paw Pressure тест

Хроничният имобилизационен стрес води до статистически значимо повишаване на болковия праг на 10-та (*p*<0.001) и на 20-та минута (*p*<0.05), спрямо контролната група.

Самостоятелното приложение на JTC-801 непосредствено след ChIS статистически значимо понижава болковия праг спрямо ChIS и контролната група за целия период на изследването (*p*<0.001).

На 10-та минута от теста при групите JTC-801+N/OFQ(1-13)NH₂, JTC-801+ [Orn⁹] и JTC-801+[Orn⁹,Orn¹³], се наблюдава статистически значимо понижаване на болковия праг спрямо ChIS (*p*<0.001). Групата JTC-801+N/OFQ(1-13)NH₂ статистически достоверно понижава болковия праг, спрямо контролната група (*p*<0.05).

На 20-та минута се наблюдава статистически значимо понижаване на болковия праг при групите JTC-801 + N/OFQ(1-13)NH₂ и JTC-801 + [Orn⁹,Orn¹³], спрямо ChIS (*p*<0.01). На 30-та минута само [Orn⁹,Orn¹³] статистически значимо понижава болковия праг спрямо ChIS (*p*<0.05), докато при останалите групи не се наблюдават значими разлики (фиг. 14).



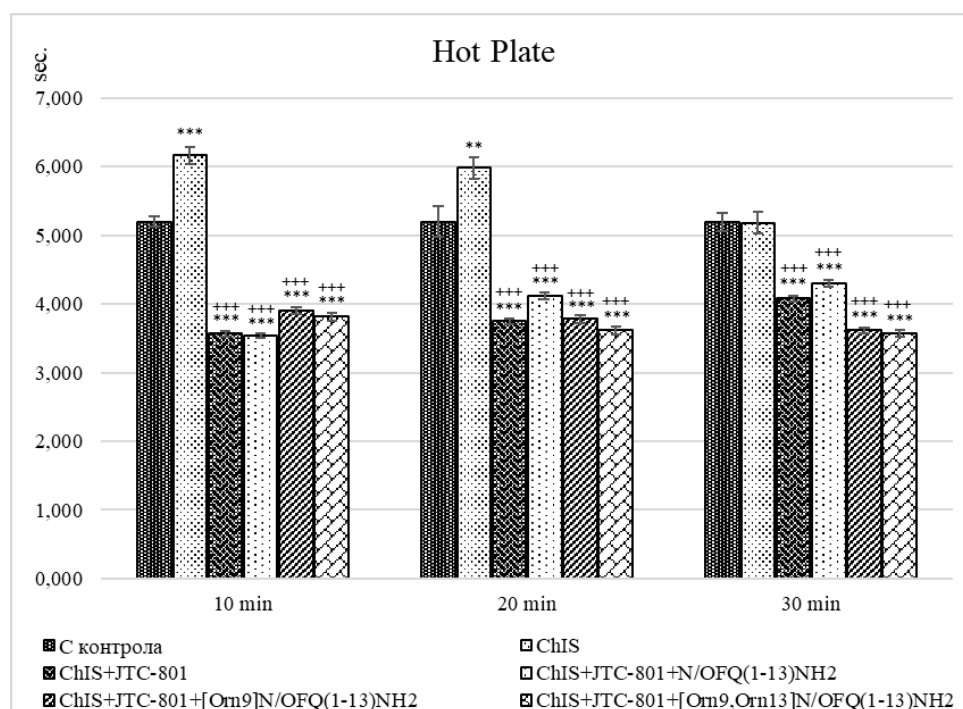
Фигура 14. Ефекти от съвместното приложение на JTC-801 (0.5 mg/kg, i.p.) с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] (10 µg/kg, i.p.) върху болковия праг след ChIS. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.; **p*<0.05; ****p*<0.001, спрямо контролата, +*p*<0.05; ++*p*<0.01; +++*p*<0.001 спрямо ChIS.

Hot Plate тест

В HP теста ChIS статистически значимо удължава латентното време спрямо контролата на 10-та (*p*<0.001) и 20-та минута (*p*<0.01).

Въвеждането на JTC-801 непосредствено след хроничния стрес статистически значимо скъсява латентното време, спрямо ChIS и контролната група за целия изследван период (*p*<0.001).

Въвеждането на JTC-801 съвместно с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] след стреса статистически значимо скъсява латентно време, спрямо ChIS и контролната група (*p*<0.001), за целия период на изследването (фиг.15).



Фигура 15. Ефекти от съвместното приложение на JTC-801 (0.5 mg/kg, i.p.) с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] (10 µg/kg, i.p.) върху НР-латентността след ChIS. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.; ***p*<0.01; ****p*<0.001, спрямо контролата, +++*p*<0.001, спрямо ChIS.

2.4. Обсъждане

Настоящото изследване имаше за цел да оцени влиянието на NOP-селективния антагонист JTC-801 върху аналгетичните ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] при интактни животни и при животни подложени на остър и хроничен имобилизационен стрес.

- Резултатите от РР и НР тестове при интактни животни показват, че NOP-селективният антагонист JTC-801 притежава изразен аналгетичен ефект, както при механична, така и при термична ноцицепция. Самостоятелното му приложение статистически значимо повишава болковия праг (*p*<0.001) спрямо контролната група за целия период на изследването (214±2.45, 176±2.45, 154±2.45 g/cm² на 10-та, 20-та и 30-та минута) (фиг. 10).

При съвместното приложение на JTC-801 с N/OFQ(1-13)NH₂ се наблюдава статистически значимо понижаване на болковия праг спрямо самостоятелното приложение на 20-та и 30-та минута (*p*<0.001), като стойностите са съответно 202±3.74, 156±2.45, 124±2.45 g/cm², спрямо 306±8.12, 210±5.48, 122±3.74 g/cm² при самостоятелно приложение на пептида (фиг. 4 и 10), което доказва, че JTC-801 антагонизира аналгетичния ефект на ноцицептина.

Аналогът [Orn⁹] самостоятелно повишава болковия праг (306±2.45, 226±5.1, 120±4.47 g/cm²), докато при съвместното му приложение с JTC-

801 статистически значимо намалява болковия праг на 10-та и 20-та минута ($p<0.001$) и на 30-та минута ($p<0.01$). Измерените стойности са значително по-ниски (188 ± 3.74 , 156.8 ± 1.02 , 138.8 ± 0.8 g/cm²), което показва антагонизиране на аналгетичния ефект на пептида (фиг. 4 и 10).

Аналогът [Orn⁹,Orn¹³] показва най-високи стойности на болковия праг при самостоятелно приложение (318 ± 3.74 , 218 ± 3.74 , 120 ± 3.16 g/cm²) (фиг. 4). В комбинация с JTC-801 статистически значимо намалява болковия праг ($p<0.001$) за целия изследван период (189.6 ± 1.33 , 152 ± 1.41 , 115.6 ± 1.33 g/cm²), което потвърждава антагонистичната роля на JTC-801(фиг. 10).

Всички пептиди показват статистически значим по-висок болков праг спрямо контролната група ($p<0.001$), което показва частично запазване на аналгетичния ефект, въпреки присъствието на антагониста.

Известно е, че NOP-рецепторите могат да медиат както проноцицептивни, така и антиноцицептивни ефекти, в зависимост от дозата, локализацията на рецепторите и физиологичния контекст. Това е добре документирано в литературата – Toll et al., съобщават, че i.c.v. приложение на ноцицептин води до проноцицепция, докато i.t. приложение индуцира аналгезия в модели на хронична болка. Подобни резултати са представени и от Нао et al., които подчертават, че супраспиналната активация на NOP-рецепторите може да потисне ефектите на μ -опиоидните агонисти, докато спиналната активация води до значимо намаляване на алодинията и хипералгезията.

В контекста на настоящото изследване, тази функционална пластичност на NOP-рецепторите би могла да обясни наблюдаваното частично запазване на аналгезията в РР теста при съвместно приложение на JTC-801 с пептидите, както и хипералгезията, отчетена в НР теста.

Резултатите от НР теста потвърждават наблюденията от РР модела. JTC-801 самостоятелно удължава латентното време за целия период на изследването, спрямо контролната група ($p<0.001$; $p<0.01$), съответно 9.6 ± 0.06 , 6.7 ± 0.10 , 5.8 ± 0.06 sec, като предизвиква аналгезия при интактни животни (фиг. 11).

При съвместното въвеждане на JTC-801 с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите се наблюдава статистически значимо скъсяване на латентното време ($p<0.01$; $p<0.001$) за целия период на изследването (фиг. 11). JTC-801 с N/OFQ(1-13)NH₂ скъсява латентното време (5.38 ± 0.06 , 5.96 ± 0.04 , 4.76 ± 0.07 sec), спрямо самостоятелното приложение на пептида (8.4 ± 0.25 , 6.4 ± 0.4 , 4.7 ± 0.14 sec), което показва антагонизиране на аналгетичния ефект на пептида (фиг. 5 и 11). Аналогът [Orn⁹] самостоятелно въведен удължава латентното време (9.1 ± 0.16 , 5.88 ± 0.15 , 5.56 ± 0.07 sec). При съвместното му приложение с JTC-801 латентното време е значително скъсено (4.72 ± 0.10 , 4.46 ± 0.09 , 3.84 ± 0.08 sec), което показва антагонизиране на аналгетичния ефект и индуциране на хипералгезия (фиг. 5 и 11). Аналогът [Orn⁹,Orn¹³] показва изразен аналгетичен ефект самостоятелно въведен (9.56 ± 0.12 ,

6.22±0.09, 4.34±0.07 sec), но при съвместното приложение с JTC-801 стойностите на латентното време са значително по-ниски (4.72±0.10, 4.32±0.08, 3.8±0.07 sec), което потвърждава антагонистичния ефект на JTC-801 върху аналгезията, индуцирана от пептидите (фиг. 5 и 11).

В настоящото изследване се наблюдава частично запазена аналгезия в PP теста, докато в HP теста се наблюдава хипералгезия.

Аналозите [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] показват изразена проноцицепция, като скъсяват латентното време спрямо контролната група на 10-та минута (p<0.01). Това може да се обясни с повишен афинитет към NOP рецептора, както е описано от Preti, Calò & Guerrini. Авторите подчертават, че модификациите в С-терминалната част на N/OFQ, включително замествания с орнитин, променят фармакодинамичния профил на пептида чрез стабилизиране на α -спиралната структура и подобряване на рецепторната селективност.

Данните от литературата подкрепят наблюдаваните ефекти на JTC-801 в настоящото изследване. Tamaï et al. и Suyama et al. демонстрират, че JTC-801 е ефективен при възпалителна болка, като потиска алодинията и хипералгезията. Това съответства на нашите наблюдения за изразен аналгетичен ефект както при механична, така и при термична стимулация. Mabuchi et al. допълват, че JTC-801 намалява болката чрез инхибиране на продукцията на азотен оксид, което предполага мултимодален механизъм на действие, включващ невроимунна модулация.

Получените от нас резултати са в съответствие с данните на Yamada et al., които показват, че JTC-801 притежава висока селективност към NOP рецептора, като антагонизира ноцицептин-индуцираното инхибиране на cAMP сигнализацията. JTC-801 индуцира аналгезия, като удължава латентното време в Hot plate теста и намалява броя на болковите реакции във втората фаза на формалин теста при гризачи. Аналгетичният ефект е най-силен в началните минути след приложение, след което отслабва.

- Резултатите от PP теста показват, че 1hIS статистически значимо повишава болковия праг спрямо контролната група за целия период на изследване (p<0.001), като индуцира аналгезия (фиг. 12). SIA се медира от активация на низходящи инхибиторни пътища, включващи ендогенни опиоиди, GABA, глутамат, моноамини и ендоканабиноиди и NOP-рецепторната система. Pola et al. и Toll et al. подчертават, че NOP-рецепторната система играе ключова роля в модулацията на болката и стрес отговора, като NOP антагонисти се разглеждат като потенциални терапевтични средства за намаляване на негативните ефекти от стреса върху болковото възприятие.

При съвместното приложение на JTC-801 с ноцицептин и аналозите след стреса се наблюдава статистически значимо понижаване на болковия праг спрямо 1hIS (p<0.001), което показва, че JTC-801 блокира аналгезията, индуцирана от стреса (фиг. 12). Това е в съответствие с

данните на Delaney et al., които демонстрират, че блокадата на NOP-рецепторите с JTC-801 променя невроендокринния отговор към остър стрес, включително активността на НРА оста и експресията на NOP-рецепторни гени. Болковият прагът е по-висок от този на контролната група, което предполага частично запазване на аналгетичния ефект, вероятно поради активност на други невромодулиращи системи, участващи в SIA. Както подчертават Butler & Finn, SIA е мултимодален процес, който включва ендogenous опиоиди, ендоканабиноиди, GABA, глутамат, окситоцин и други невротрансмитери, активирани чрез низходящи инхибиторни пътища от мозъчната кора към гръбначния мозък. Pola et al. посочват, че NOP-рецепторната система е само един от компонентите на сложната невронална мрежа, регулираща взаимодействието между стрес и болка. Те подчертават, че блокадата на NOP-рецепторите не елиминира напълно SIA, което съответства на наблюдаваното частично запазване на аналгезията в настоящото изследване.

Резултатите от НР теста показват, че 1hIS удължава латентното време само на 10-та минута ($p < 0.05$), което е в съответствие с краткотрайна активация на ендogenous аналгетични механизми, характерни за SIA (фиг. 13). В НР теста приложението на JTC-801 с аналозите води до статистически значимо скъсяване на латентното време при $[Orn^9]$ ($p < 0.001$) и $[Orn^9, Orn^{13}]$ ($p < 0.05$), което потвърждава антагонистичната роля на JTC-801 и предполага проноцицептивна активност на пептидите в условия на стрес (фиг. 13).

Активацията на NOP-рецепторите води до инхибиране на Cav2.2 канали чрез G-протиен зависими механизми, което намалява невронната възбудимост и освобождаването на болкови медиатори. Блокадата на рецепторите с JTC-801 може да прекъсне този инхибиторен ефект, водейки до възстановяване на болковата чувствителност, особено в условия на стрес, когато NOP системата е активирана. Известно е, че NOP-рецепторите участват в регулацията на НРА оста, която се активира при стрес. Активацията на NOP-рецепторите в ЦНС модулира освобождаването на кортикостероиди, които от своя страна участват в ендogenous аналгезия, характерна за остър стрес. Според Castro et al. стрес системата, включва CRH и норадренергични пътища, които участват в регулацията на НРА оста, а глюкокортикоидите, освободени в отговор на стрес, упражняват негативна обратна връзка върху CRH и АСТН, като по този начин модулират болковата чувствителност. Блокадата на NOP-рецепторите с JTC-801 може да наруши тази регулация, като намали освобождаването на кортикостероиди и потисне активирането на низходящите инхибиторни пътища, което води до понижаване на SIA.

Това е в съответствие с нашите резултати от РР и НР тестовете, където при съвместно приложение на JTC-801 с ноцицептин и аналозите

след стрес се наблюдава статистически значимо понижаване на болковия праг спрямо групата 1hIS, което показва, че блокадата на NOP-рецепторите компрометира ендогенната аналгезия.

Известно е, че при остър стрес се активират низходящи инхибиторни пътища, включващи ендогенни опиоиди, които потискат болковата чувствителност. NOP-рецепторите взаимодействат с опиоидната система, като модулират освобождаването на невротрансмитери и хормони, участващи в болковата регулация. Блокадата на NOP-рецептора с JTC-801 може да доведе до дисбаланс между опиоидната и ноцицептинергичната активност, което се проявява в нашите резултати чрез частично запазване на аналгезията, но и възможна проноцицепция от страна на аналозите, особено в ранните минути след стреса. Това е в съответствие с данните на al'Absi, Nakajima & Bruehl, които показват, че блокадата на опиоидната система с антагонист (налтрексон) елиминира ефектите на SIA, особено при термични и механични болкови стимули. Авторите подчертават, че ендогенната опиоидна система е ключов медиатор на SIA, но нейното взаимодействие с други системи, включително NOP, може да модифицира болковата реакция в зависимост от типа стрес и болковия стимул. Наблюдаваните ефекти от настоящото изследване могат да бъдат сравнени с данни от други модели на стрес и болка. При хроничен стрес, като многократна имобилизация или социална изолация, често се наблюдава стрес-индуцирана хипералгезия (SIH), за разлика от 1hIS, който води до SIA. Според Pola et al. NOP-рецепторната система участва както в SIA, така и в SIH, като ефектът зависи от продължителността и интензитета на стреса. В модел на посттравматично стресово разстройство (PTSD) се наблюдава персистираща механична алодиния и термична хипералгезия до 28 дни след стреса. Zhang et al. съобщават за повишени нива на ноцицептин в ЦНС и серум, както и намалена глюкокортикоидна секреция, което показва дисрегулация на HPA оста. В модел на студов стрес показахме, че аналгетичните ефекти на аналозите [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] се медираат от опиоидната, ноцицептинергичната и NO-системата. Delaney et al. показват, че остър и повторен стрес променят експресията на NOP рецепторите в лимбични структури като хипоталамус и хипокамп. Това предполага, че NOP системата е чувствителна към стресови въздействия и че фармакологичната блокада чрез JTC-801 може да прекъсне централни механизми, участващи в болковата модулация.

Резултатите от настоящото показват, че N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] потискат имобилизационната SIA след блокада на NOP рецептора, като показват различна антистресорна активност в зависимост от вида на теста. В PP теста 1hIS статистически значимо повишава прага на болката ($p < 0.001$) спрямо контролната група (до 95% на 10-та минута), което показва наличието на SIA. При съвместното приложение на JTC-801 с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите се наблюдава

статистически значимо понижаване на прага на болката за целия период на изследването ($p < 0.01$; $p < 0.001$) спрямо 1hIS. N/OFQ(1-13)NH₂ намалява прага на болката с 32% на 10-та минута; [Orn⁹] с 26.45%; [Orn⁹,Orn¹³] потиска най-силно SIA с 35% на 10-та минута спрямо 1hIS (фиг. 12).

В НР теста, ефектът на SIA е по-слаб и краткотраен, като се наблюдава статистически значимо удължаване на латентно време спрямо контролата ($p < 0.05$), само на 10-та минута (~21%). При съвместното приложение на JTC-801 с ноцицептин и аналозите след стреса латентното време се скъсява статистически значимо на 10-та минута спрямо 1hIS ($p < 0.05$ при [Orn⁹,Orn¹³] и $p < 0.001$ при [Orn⁹]). [Orn⁹] потиска SIA с ~25.7%, а [Orn⁹,Orn¹³] и N/OFQ(1-13)NH₂ имат по-слаб ефект (~15%). На 20-та и 30-та минута ефекта е минимален или липсва (фиг. 13).

Нашите резултати показват, че NOP-рецепторната система участва в модулирането на SIA, като антистресорната активност на N/OFQ и неговите аналози е зависима от типа на болковия стимул.

- Резултатите от РР теста показват, че ChIS води до статистически значимо повишаване на болковия праг на 10-та ($p < 0.001$) и 20-та минута ($p < 0.05$), спрямо контролната група, като предизвиква аналгезия (фиг. 14). Аналогично, резултатите от НР теста показват удължено латентно време на 10-та ($p < 0.001$) и 20-та минута ($p < 0.01$), спрямо контролната група (фиг. 15). Това съответства на феномена стрес-индуцирана аналгезия, при който остър или начална фаза на хроничен стрес активира ендогенни антиноцицептивни механизми. В условията на хроничен стрес се наблюдава преход към SIH, особено при продължителна експозиция или при фармакологична намеса, както е показано от Polá et al.

Нашите резултати показват, че приложението на JTC-801 непосредствено след стреса води до значимо понижение на болковия праг и латентното време спрямо ChIS и контролната група за целия период на изследването ($p < 0.001$), като предизвиква хипералгезия и потвърждава хипотезата, че блокадата на NOP-рецептора нарушава ендогенната антиноцицептивна регулация (фиг. 14 и 15).

Известно е, че хроничният стрес активира НРА оста, повишава нивата на глюкокортикоиди и води до централна сенситизация чрез възпалителни и невроендокринни медиатори, като CRF, IL-1 β и TNF- α . Невровъзпалителните процеси в гръбначния мозък, описани от Rivat и колеги, предизвикват сензорна хиперчувствителност и дълготрайна хипералгезия, което също би могло да обясни наблюдаваните от нас резултати. Scheich et al. показват, че хроничният стрес индуцира механична хипералгезия чрез капсаицин-чувствителни неврони, което допълнително подкрепя хипотезата за централна сенситизация и участие на периферни ноцицептивни механизми. Данните на Feng et al. показват, че хроничната имобилизация води до развитие на толерантност към антиноцицептивния ефект на стреса, чрез намалена експресия на POMC и

β-ендорфин, както и активация на възпалителни сигнални пътища като MAPK, COX-2 и iNOS. Тези промени в централната и периферната нервна система допринасят за десенситизацията на антиноцицептивните системи и повишената болкова чувствителност. В настоящото изследване, това би могло да обясни отслабването на ефекта на ноцицептин и неговите аналози при хроничен стрес, както и усиляването на хипералгезията при блокадата на NOP-рецептора.

Комбинираното приложение на JTC-801 с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] след стреса, води до статистически значимо понижаване на болковия праг (PP тест), спрямо ChIS (p<0.001) на 10-та минута, което показва, че блокадата на NOP-рецептора отслабва аналгетичния ефект на пептидите. На 20-та минута, статистически значимо понижаване на болковия праг (p<0.01) се наблюдава при N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹,Orn¹³], а на 30-та минута само при [Orn⁹,Orn¹³], (p<0.05) (фиг. 14). В HP теста, N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите показват статистически значимо скъсяване на латентното време спрямо ChIS и контролната група за целия период (p<0.001), което свидетелства за повишена болкова чувствителност и хипералгезия. Резултатите показват, че блокадата на NOP-рецептора напълно потиска аналгетичния ефект на пептидите в условията на хроничен стрес (фиг. 15).

Известно е, че NOP-рецепторите и N/OFQ са експресирани в хипоталамуса и лимбичната система – ключови структури за регулация на стрес отговора. Острият стрес от задържане води до намалена експресия на ppN/OFQ и NOP mRNA в хипокампа и хипоталамуса, докато повторният стрес предизвиква компенсаторни промени, включително повишена експресия в BNST и ретикуларния таламус. Това предполага адаптивна роля на NOP-системата, която може да бъде нарушена чрез фармакологична блокада. NOP-рецепторите играят ключова роля в регулацията на болковите сигнали чрез инхибиране на невротрансмитерно освобождаване и модулация на невронната възбудимост в гръбначния мозък. Блокадата им чрез JTC-801 води до дисбаланс между антиноцицептивни и проноцицептивни сигнали, което се проявява като хипералгезия.

Приложението на JTC-801 в нашето изследване разкрива ролята на NOP-рецептора в болковата регулация при стрес. При посттравматичен стрес, Zhang et al. демонстрират, че JTC-801 притежава както аналгетичен, така и анксиолитичен ефект. При плъхове, изложени на еднократен продължителен стрес, JTC-801 значимо намалява механичната алодиния и термичната хипералгезия, нормализира нивата на кортикостерон и блокира повишената експресия на NOP-рецептора в амигдалата и PAG. Тези данни подчертават модулиращата роля на NOP-системата в условия на стрес и предполагат, че JTC-801 може да се използва при съпътстващи болкови и тревожни разстройства.

В настоящото изследване JTC-801 индуцира хипералгезия при животни, подложени на ChIS. Това разминаване показва, че NOP-рецепторната модулация може да варира в зависимост от вида и продължителността на стреса и физиологичното състояние на животните. Различията между моделите (PTSD vs. ChIS) показват, че NOP-системата участва в различни механизми на болкова регулация, което налага допълнителни изследвания за изясняване на нейната роля. Изследванията на Porro & Carli и Molina et al. показват, че различните форми на физическо ограничение – имобилизация и стрес от задържане, водят до различни болкови реакции, включително хипоалгезия и хипералгезия, в зависимост от продължителността и интензитета на експозицията. Това подкрепя избора на модел в настоящото изследване и обосновава наблюдаваните резултати.

Резултатите от двата използвани ноцицептивни теста показват, че в НР теста хипералгезиращият ефект от съвместно приложение на NOP-селективния антагонист с N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите аналози е по-силен и устойчив. При всички пептиди се наблюдава скъсено латентното време спрямо контролната група, докато прагът на механичната болка в РР теста се понижава статистически значимо на 10-та минута. При съвместното приложение на JTC-801 с [Orn⁹,Orn¹³] се отчита скъсяване на латентното време с 31.4% спрямо контролата, докато болковия праг намалява едва с 4.8%. Подобна тенденция се наблюдава и при другите пептидни варианти, като термичният тест показва средно с 25–30% по-силен хипералгезиращ ефект. Ефектът се запазва във времето, което предполага по-висока чувствителност на термичната ноцицепция към NOP-рецепторната блокада при хроничен стрес (фиг. 14 и 15).

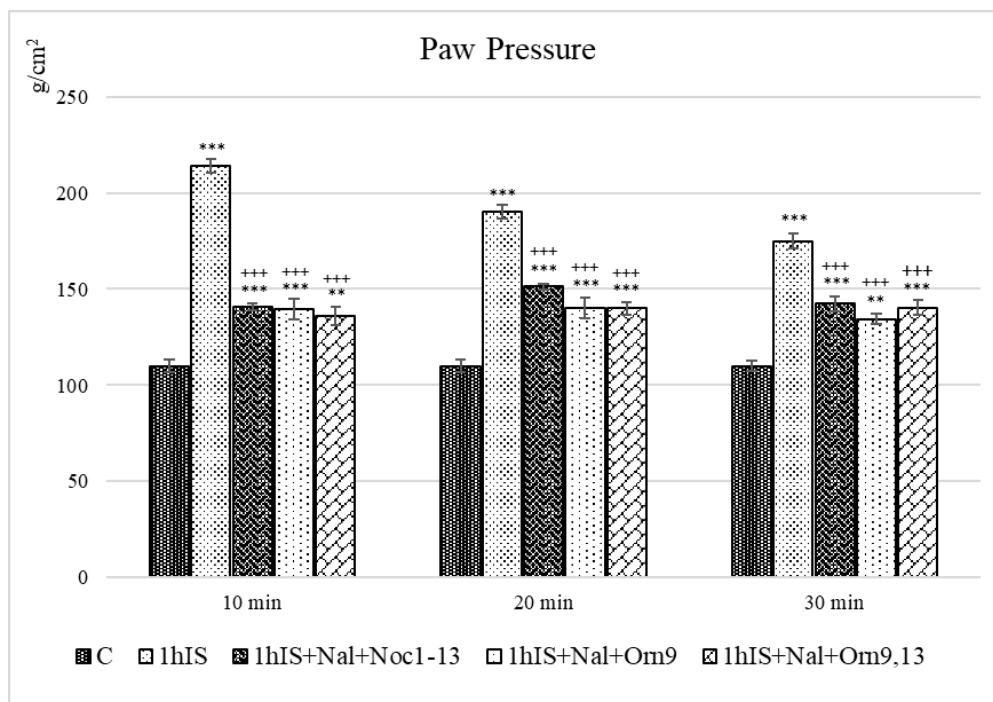
3. Влияние на неселективния опиоиден рецепторен антагонист налоксон (Nal) върху аналгетичните ефекти на ноцицептин N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] при:

3.1. животни, подложени на 1hIS

Paw Pressure тест

Групата подложена на 1hIS статистически значимо повишава прага на болката, спрямо контролната група ($p < 0.001$) за целия период на изследване, което потвърждава наличието на стрес-индуцирана аналгезия.

При комбинираното въвеждане на Nal с ноцицептин и аналозите – [Orn⁹], [Orn⁹,Orn¹³] след стреса, се наблюдава статистически значимо понижение на болковия праг спрямо 1hIS групата ($p < 0.001$), за целия период на изследването. Спрямо контролната група се наблюдава статистически значимо повишение на болковия праг ($p < 0.01$; $p < 0.001$) за целия изследван период (фиг. 16).



Фигура 16. Ефекти на Nal (1 mg/kg, i.p.), приложен с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] (10 µg/kg, i.p), върху болковия праг след 1hIS. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.; *p<0.01; **p<0.001 спрямо контролата; +++p<0.001 спрямо 1hIS.

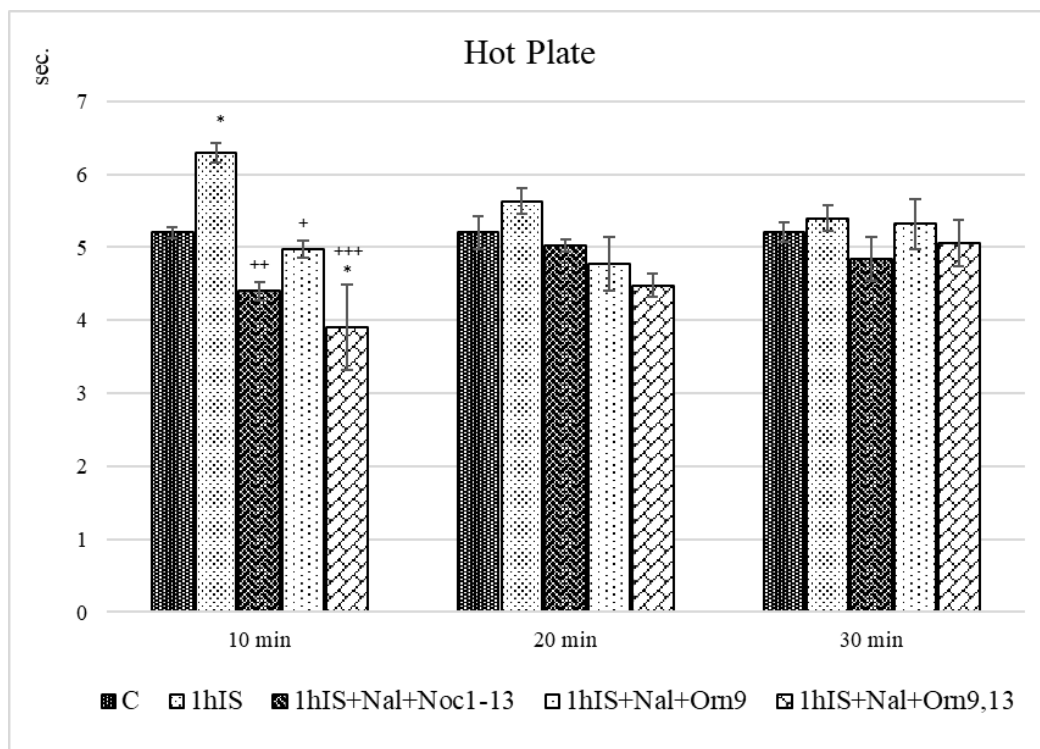
Hot Plate тест

Групата подложена на 1hIS статистически значимо удължава латентното време спрямо контролната група (p<0.01), на 10-та минута от теста.

При комбинираното въвеждане на Nal с ноцицептин и аналозите се наблюдава статистически значимо скъсяване на латентното време спрямо 1hIS на 10 минута – (p<0.01) при N/OFQ(1-13)NH₂, (p<0.05) при [Orn⁹] и (p<0.001) при [Orn⁹,Orn¹³].

Аналогът [Orn⁹,Orn¹³] статистически значимо скъсява латентното време спрямо контролната група на 10-та минута от теста (p<0.05).

На 20-та и 30-та минута не се наблюдават статистически значими разлики между групите (фиг. 17).



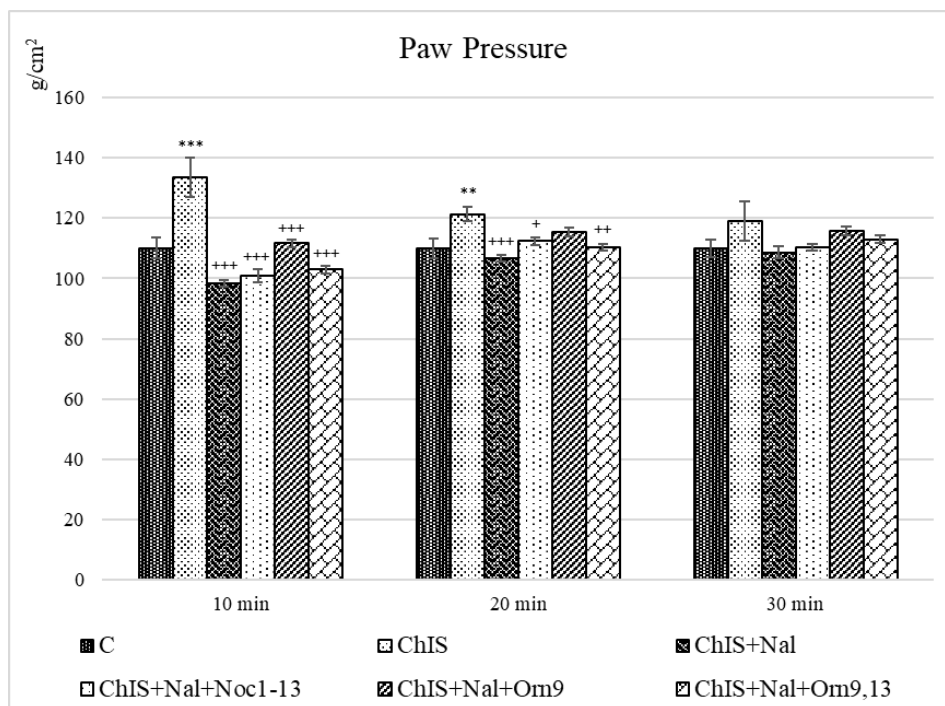
Фигура 17. Ефекти на Nal (1 mg/kg, i.p.), приложен съвместно с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] (10 µg/kg, i.p), върху HP-латентността след 1hIS. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.; *p<0.05; спрямо контролата; +p<0.05; ++p<0.01; +++p<0.001 спрямо 1hIS.

3.2. Влияние на неселективния опиоиден рецепторен антагонист Nal върху аналгетичните ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] при животни, подложени на ChIS.

Paw Pressure тест

Резултатите от PP теста показват, че ChIS води до статистически значимо повишаване на болковия праг на 10-та минута (p<0.001) и на 20-та минута (p<0.01) спрямо контролната група.

Прилагането на Nal след стреса води до статистическо значимо понижение на болковия праг спрямо ChIS (p<0.001), на 10-та и 20-та минута. Комбинираното приложение на Nal с ноцицептин N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите след стреса, води до статистически значимо понижение на болковия праг спрямо ChIS на 10-та минута (p<0.001). На 20-та минута се наблюдава статистически значимо понижение на болковия праг (p<0.05) при N/OFQ(1-13)NH₂ и (p<0.01) [Orn⁹,Orn¹³], спрямо ChIS групата. На 30-та минута не се наблюдават статистически значими разлики между групите (фиг. 18).



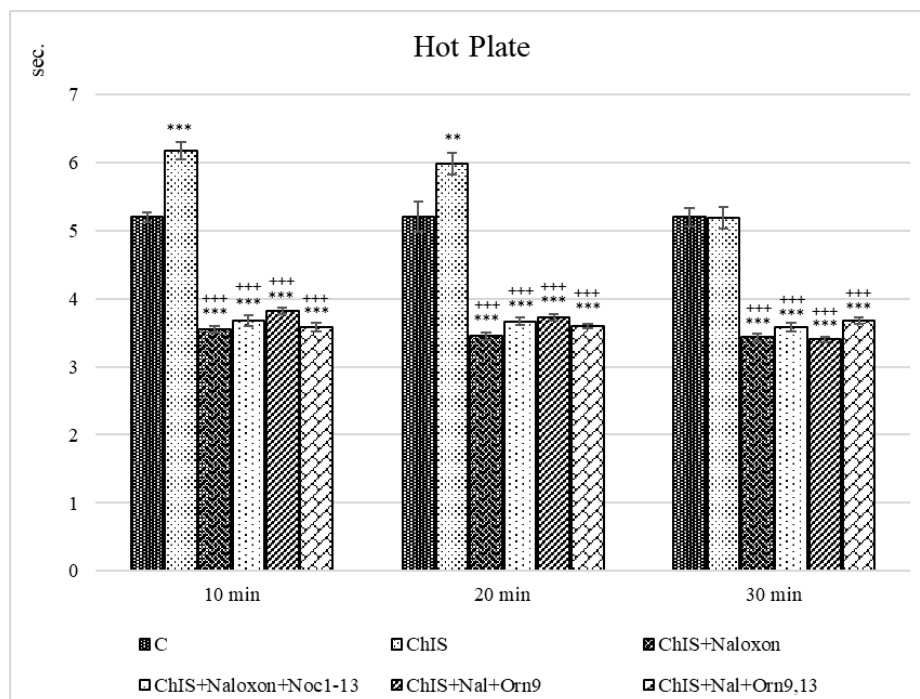
Фигура 18. Ефекти на Nal (1 mg/kg, i.p.), приложен съвместно с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] (10 µg/kg, i.p), върху болковия праг след ChIS. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.; **p<0.01; ***p<0.001 спрямо контролата; ++p<0.01; +++p<0.001 спрямо ChIS.

Hot Plate test

В HP теста, ChIS води до статистически значимо удължаване на латентно време спрямо контролната група на 10-та (p<0.001) и 20-та минута (p<0.01).

Прилагането на Nal непосредствено след стреса води до статистически значимо скъсяване на латентното време спрямо контролата и ChIS за целия период на изследването (p<0.001), което показва изразена хипералгезия.

Комбинираното приложение на Nal с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] след стреса, води до статистически значимо скъсяване на латентното време спрямо контролата и ChIS (p<0.001) (фиг. 19).



Фигура 19. Ефекти на Nal (1 mg/kg, i.p.), приложен съвместно с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] (10 µg/kg, i.p), върху HP-латентността след ChIS. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.; **p<0.01; ***p<0.001 спрямо контролата; +++p<0.001 спрямо ChIS.

3.3. Обсъждане

Настоящото изследване имаше за цел да оцени влиянието на неселективния опиоиден рецепторен антагонист Nal върху аналгетичната активност на ноцицептин N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите структурни аналози [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] при животни, подложени на остър и хроничен имобилизационен стрес.

Налоксон е неселективен антагонист на класическите опиоидни рецептори – μ , δ и κ , използван както в клиничната практика, така и в експериментални модели за оценка на функционалната активност на ендогенната опиоидна система.

- Известно е, че имобилизационният стрес предизвиква повишаване на антиноцицепцията при tail-flick, hot-plate и formalin tests. Изследвания на Amir и Amit показват, че налоксонът при tail-flick и hot-plate редуцира инхибицията на отговорите при имобилизационен стрес, което потвърждава участието на опиоидната система.

Нашите резултати показват, че N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите приложени съвместно с налоксон след 1hIS статистически значимо понижават болковия праг (p<0.001) и скъсяват латентното време (p<0.01, N/OFQ(1-13)NH₂; p<0.05, [Orn⁹]; p<0.001, [Orn⁹,Orn¹³]), спрямо групата,

подложена на стрес, което показва, че Nal антагонизира SIA и аналгетичния ефект на пептидите (фиг. 16 и 17).

Характерно за ноцицептиновата система е, че тя може да антагонизира ефектите на класическите опиоиди. Пептидите от този клас потискат морфиновата аналгезия, понижават толерантността към леворфанол и могат да индуцират синдром на абстиненция при животни със зависимост към морфин. Това предполага, че ноцицептин и аналозите взаимодействат с опиоидната система по сложен и контекст-зависим начин, като в случая потискат имобилизационната SIA.

Сравнителният анализ от двата теста (PP и HP) показва, че ефектът от съвместното приложение на налоксон с ноцицептин и аналозите след 1hIS е по-изразен в термичния тест, особено в ранните минути, където латентното време статистически значимо се понижава под контролните стойности. Най-изразена хипералгезия се наблюдава при Nal+[Orn⁹,Orn¹³] на 10-та минута (~25%), последвана от Nal+ N/OFQ(1-13)NH₂ (~15%) и Nal+[Orn⁹] (~4%). В PP теста стойностите на болковия праг при всички групи са статистически значимо по-високи ($p < 0.001$), спрямо контролата (~29%), без данни за хипералгезия. Резултатите потвърждават участието на опиоидната система в ефектите на пептидите при 1hIS.

- Хроничният имобилизационен стрес е широко признат и утвърден експериментален модел, използван за индуциране на физиологични и поведенчески промени, включително депресивноподобно поведение, тревожност, както и промени в болковата чувствителност. Множество проучвания показват, че ChIS води до значими невротични и структурни изменения в мозъчни региони като хипокамп и префронталната кора, включително дисрегулация на допамин- и GABA-ергичната системи, както и активация на HPA-оста и повишена невровъзпалителна активност.

Хроничният стрес е свързан с промени в експресията и чувствителността на μ -, δ - и κ -опиоидните рецептори. Обикновено се наблюдава намалена активност на μ - и δ -рецепторите и компенсаторно повишена активност на κ -рецепторите. Тази дисрегулация на ендогенната опиоидна система води до отслабване на аналгетичния отговор и повишаване на болковата чувствителност, особено при продължително излагане на стрес.

Прилагането на Nal непосредствено след хроничния стрес води до статистически значимо понижаване на болковия праг на 10-та и 20-та минута ($p < 0.001$) спрямо ChIS (фиг.18), както и до скъсяване на латентното време спрямо ChIS и контролната група ($p < 0.001$) за целия период на изследването (фиг.19). Резултатите показват, че блокирането на опиоидните рецептори потиска напълно аналгезията индуциран от стреса и води до хипералгезия, което потвърждава ключовата роля на ендогенната

опиоидна система в модулацията на болковата чувствителност при хроничен стрес.

Комбинираното приложение на Nal с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] статистически значимо понижава болковия праг (p<0.001), спрямо ChIS групата и скъсява латентното време (p<0.001), спрямо ChIS и контролната група в НР теста, като предизвиква хипералгезия в условия на опиоидна блокада (фиг.18 и 19).

Според данни от литературата, ноцицептинът може да инхибира опиоидно-медираната аналгезия и да индуцира хипералгезия, в условия на стрес. Това действие се осъществява чрез активиране на NOP рецепторите, които са структурно сходни с класическите опиоидни рецептори, но притежават уникални фармакологични характеристики.

Налоксонът като неселективен антагонист на опиоидните рецептори блокира действието на ендогенните опиоиди и разкрива ролята на други невромодулиращи системи, включително ноцицептиновата. Взаимодействието между опиоидната и NOP-рецепторната система е от съществено значение за разбирането на механизмите на болковата перцепция в условия на хроничен стрес.

В РР теста групата, подложена на стрес повишава болковия праг с 21.5% спрямо контролата, което потвърждава SIA. Прилагането на Nal води до понижение на болковия праг с 26.5% спрямо ChIS групата на 10-та минута, което показва блокада на опиоидно-медираната аналгезия. Съвместното приложение на Nal с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите също води до значимо понижаване на болковия праг на 10-та и 20-та минута спрямо ChIS. В НР теста Nal скъсява латентното време с ~42% спрямо ChIS групата. Съвместното приложение на ноцицептин и неговите аналози с налоксон редуцира латентното време с 38%-41%, спрямо групата подложена на стрес. Резултатите показват, че термичната ноцицепция е по-чувствителна към опиоидна блокада и, че аналозите значимо намаляват латентното време спрямо контролната група, индуцирайки хипералгезия.

4. Влияние на азотноокисната система върху аналгетичните ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³], чрез L-NAME (инхибитор на азотноокисната синтаза, NOS) и L-arginine (прекурсор на NO) при:

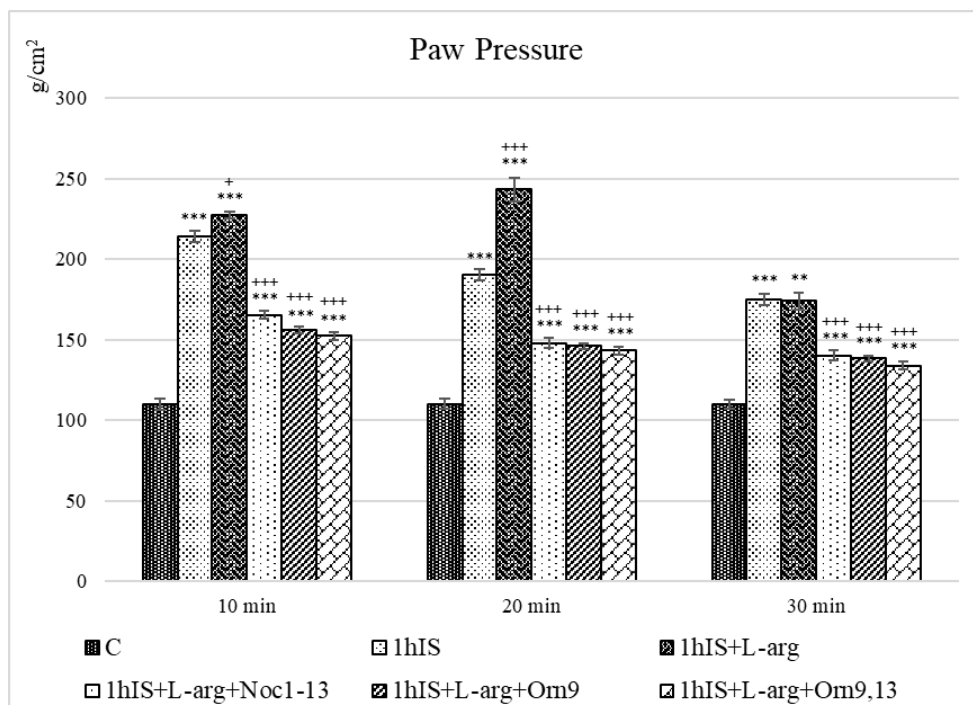
4.1. животни, подложени на 1hIS

Paw Pressure test

Групата, подложена на 1hIS статистически значимо повишава болковия праг спрямо контролата (p<0,001), за целия период на изследването.

При въвеждането на L-arg след стреса се наблюдава статистически значимо повишаване на болковия праг (p<0,001), спрямо контролата и (p<0,05; p<0,001), спрямо 1hIS групата на 10-та и 20-та минута.

При комбинираното приложение на L-arg с ноцицептин и аналозите се наблюдава статистически значимо понижаване на болковия праг ($p < 0,001$), спрямо 1hIS и контролната група за целия период на изследването (фиг. 20).

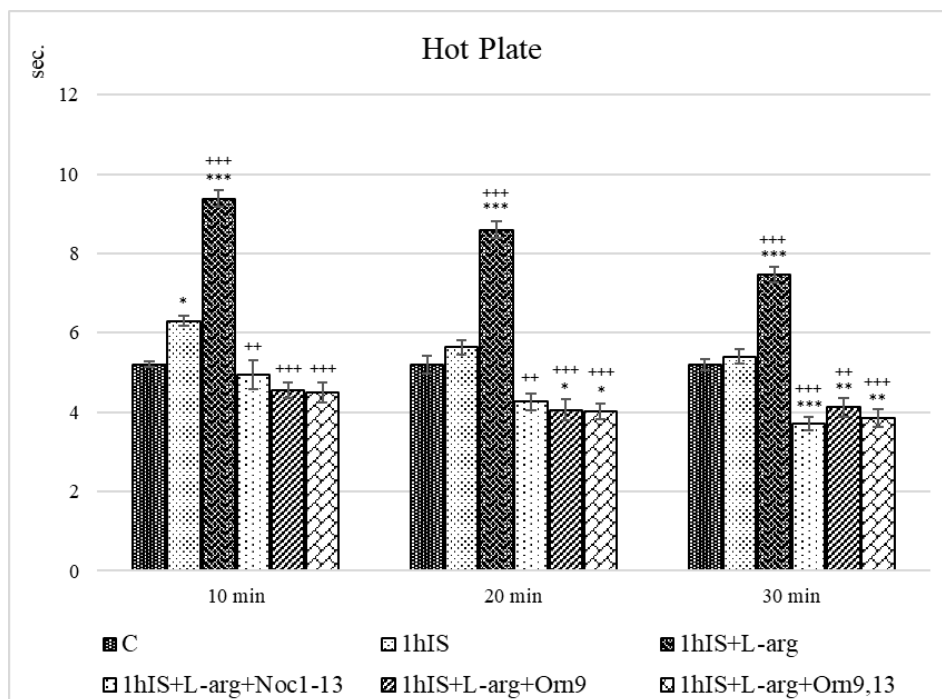


Фигура 20. Ефекти на L-arg (1 mg/kg, i.p.) при съвместното му въвеждане с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹, Orn¹³] върху болковия праг след 1hIS. Данните са представени като средни стойности $\pm$ S.E.M.; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ спрямо контролата; + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$, спрямо 1hIS.

Hot Plate тест

Острият имобилизационен стрес статистически значимо удължава латентното време ($p < 0.05$), спрямо контролата на 10-та минута.

L-arg след стреса статистически значимо удължава латентното време ($p < 0.001$), спрямо контролата и 1hIS за целия период на изследването. При групите – 1hIS+L-arg+N/OFQ(1-13)NH₂, 1hIS+L-arg+[Orn⁹] и 1hIS+L-arg+[Orn⁹, Orn¹³] се наблюдава статистически значимо скъсено латентното време ($p < 0.01$; $p < 0.001$), спрямо 1hIS за целия период на теста и ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$), спрямо контролната група на 20-та и 30-та минута от изследването (фиг. 21).

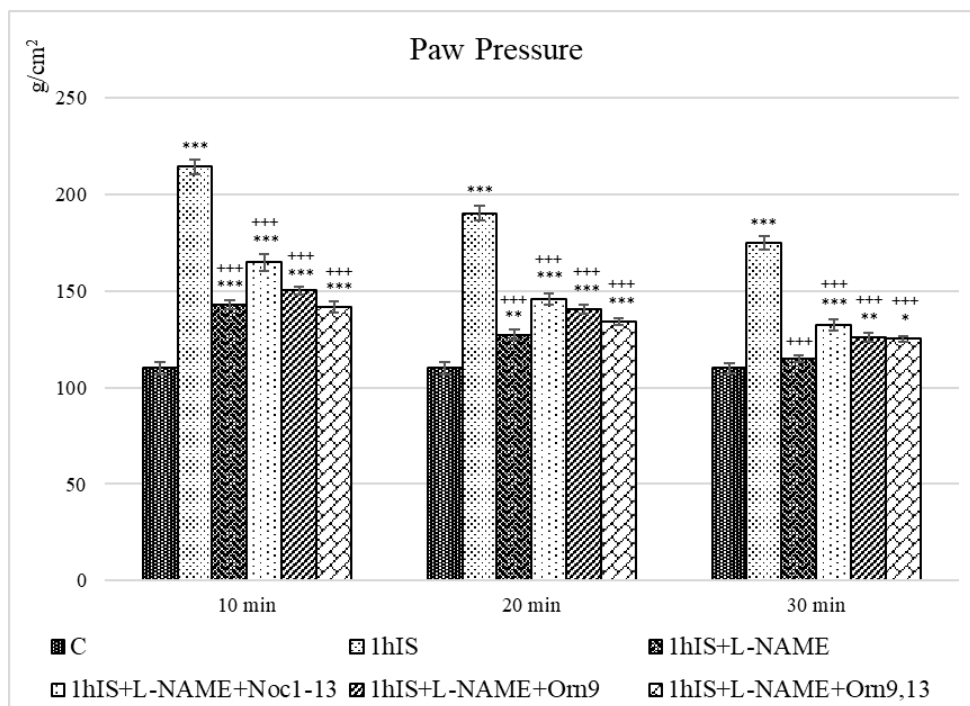


Фигура 21. Ефекти на *L-arg* (1 mg/kg, i.p.) при съвместното му въвеждане с *N/OFQ(1-13)NH₂* и аналози – [*Orn⁹*] и [*Orn⁹,Orn¹³*] върху *HP*-латентността след *1hIS*. Данните са представени като средни стойности $\pm$ S.E.M.; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, спрямо контролата; ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$, спрямо *1hIS*.

Paw Pressure test

Въвеждането на *L-NAME* (10 mg/kg, i.p.) непосредствено след стреса, статистически значимо понижава болковия праг ($p < 0.001$), спрямо *1hIS* групата за целия период на изследването. В сравнение с контролната група се наблюдава статистически значимо повишение на болковия праг на 10-та минута ($p < 0.001$) и на 20-та минута ($p < 0.01$).

Комбинираното приложение на *L-NAME* с *N/OFQ(1-13)NH₂* и аналозите – [*Orn⁹*] и [*Orn⁹,Orn¹³*] статистически значимо понижава болковия праг ($p < 0.001$), спрямо *1hIS* за целия период на изследването. Спрямо контролната група се наблюдава статистически значимо повишение на болковия праг ($p < 0.001$) на 10-та и 20-та минута. На 30-та минута се наблюдава статистически значимо повишение на болковия праг, спрямо контролата ($p < 0.001$) при *L-NAME* + *N/OFQ(1-13)NH₂*, ($p < 0.01$) при *L-NAME* + [*Orn⁹*] и ($p < 0.05$) при *L-NAME* + [*Orn⁹,Orn¹³*] (фиг. 22).

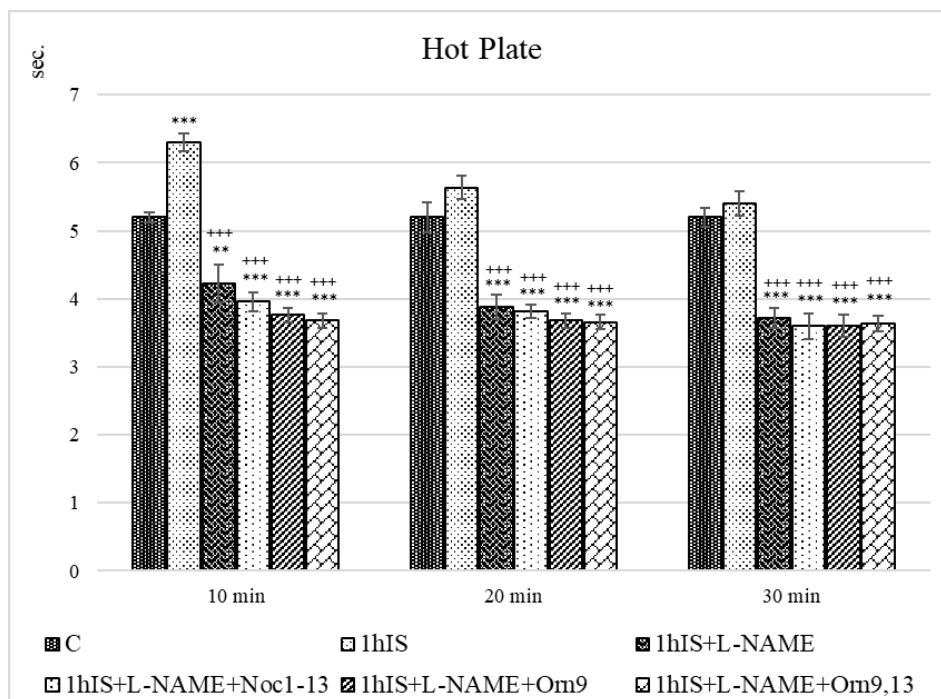


Фигура 22. Ефекти на L-NAME (10 mg/kg, i.p.) при съвместното му приложение с N/OFQ(1–13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] върху болковия праг след 1hIS. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.; **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001, спрямо контролата; +++*p*<0.001, спрямо 1hIS.

Hot Plate test

Приложението на L-NAME след стреса води до статистически значимо скъсяване на латентното време, спрямо контролната група (*p*<0.01), на 10-та и (*p*<0.001), на 20-та и 30-та минута и спрямо 1hIS (*p*<0.001), за целия период на теста.

Комбинираното приложение на L-NAME с N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] води до статистически значимо скъсяване на латентното време (*p*<0.001), спрямо контролата и 1hIS групата за целия период на изследването (фиг. 23).



Фигура 23. Ефекти на L-NAME (10 mg/kg, i.p.) при съвместното му приложение с N/OAQ(1–13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] върху HP-латентността след 1hIS. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.; **p<0.01; ***p<0.001, спрямо контролата; +++p<0.001, спрямо 1hIS.

4.2. Влияние на азотноокисната система върху аналгетичните ефекти на N/OAQ(1–13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³], чрез L-NAME и L-arg при животни, подложени на ChIS.

Paw Pressure test

При групата, подложена на ChIS се наблюдава статистически значимо повишаване на болковия праг на 10-та минута от теста (p<0.01), спрямо контролната група.

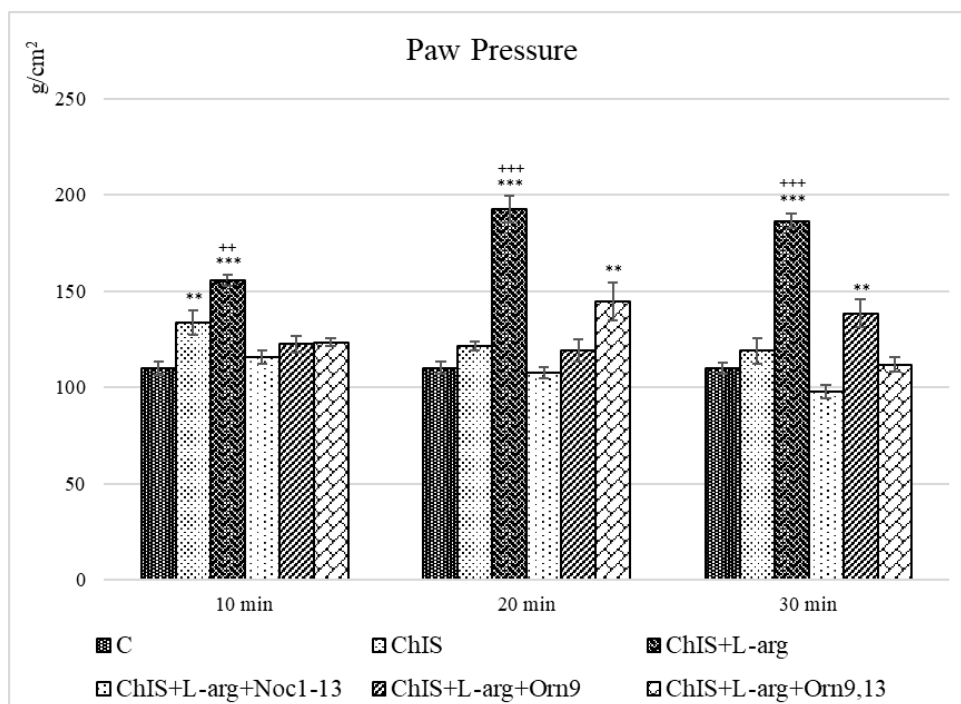
Самостоятелното приложение на L-arg непосредствено след стреса води до статистически значимо повишаване на болковия праг спрямо контролата (p<0.001) и спрямо ChIS групата (p<0.01; p<0.001) за целия период на изследването.

На 10-та минута при съвместното приложение на L-arg с пептидите болковия праг се понижава, като не се наблюдават статистически значими разлики спрямо ChIS групата.

На 20-та минута при групата L-arg + [Orn⁹,Orn¹³] се наблюдава статистически значимо повишаване на болковия праг спрямо контролата (p<0.01). Спрямо ChIS болковия праг бе повишен, но без статистическа значима разлика.

На 30-та минута групата L-arg+[Orn⁹] показва статистически значимо повишение на болковия праг спрямо контролата ($p<0.01$). Спрямо ChIS болковия праг бе повишен, но без статистическа значима разлика.

При L-arg+N/OFQ(1-13)NH₂ се наблюдава понижаване на болковия праг спрямо контролата и ChIS групата на 20-та и 30-та минута, но без статистическа значима разлика (фиг. 24).



Фигура 24. Ефекти на L-arginine (1 mg/kg, i.p.) при съвместното му приложение с N/OFQ(1–13)NH₂, [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] върху болковия праг след ChIS. Данните са представени като средни стойности $\pm$ S.E.M.; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ спрямо контролата; ++ $p<0.01$; +++ $p<0.001$, спрямо ChIS.

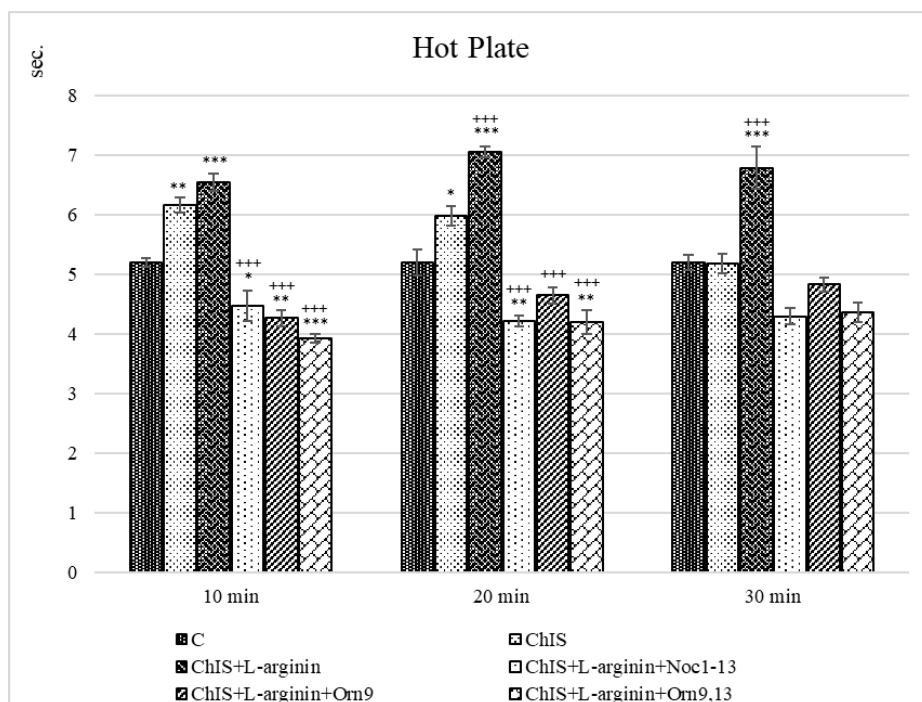
Hot Plate тест

Групата подложена на ChIS показва статистически значимо удължено латентното време на 10-та и на 20-та минута ($p<0.01$ и $p<0.05$, съответно), спрямо контролната група, а на 30-та минута прага бе съизмерим с контролата.

Приложението на L-arg непосредствено след стреса доведе до статистически значимо удължено латентно време, спрямо контролата ($p<0.001$) за целия период на изследването и спрямо ChIS на 20-та и 30-та минута ($p<0.001$).

При групите с комбинирано приложение – ChIS+L-arg+N/OFQ(1-13)NH₂, ChIS+L-arg+[Orn⁹], ChIS+L-arg+[Orn⁹,Orn¹³] се наблюдава статистически значимо скъсяване на латентното време, спрямо контролата ($p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.001$) и спрямо ChIS групата ($p<0.001$), на 10-та и 20-та

минута. На 30-та минута болковия праг се запазва понижен спрямо контролата и ChIS, но без статистическа значима разлика (фиг. 25).



Фигура 25. Ефекти на *L-arg* (1 mg/kg, i.p.) при съвместното му приложение с *N/OFQ(1–13)NH₂* и аналози – [*Orn*⁹] и [*Orn*⁹,*Orn*¹³] върху *HP*-латентността след *ChIS*. Данните са представени като средни стойности $\pm$ S.E.M.; **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001 спрямо контролата; +++*p*<0.001, спрямо *ChIS*.

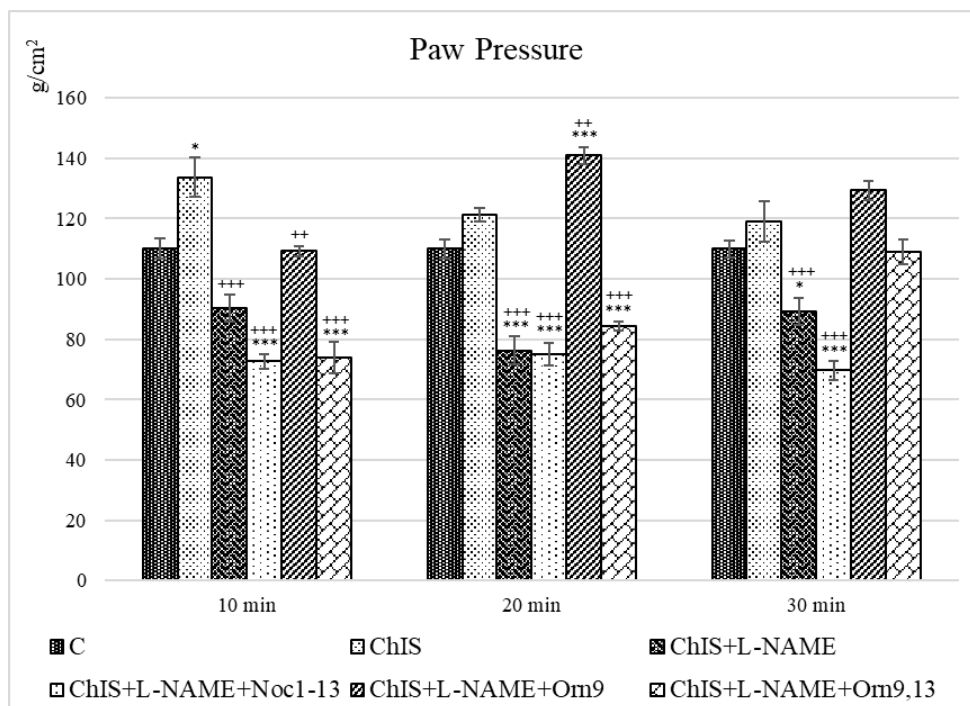
Paw Pressure test

Приложението на *L-NAME* след стреса води до статистически значимо понижение на болковия праг спрямо *ChIS* (*p*<0.001), за целия период на изследването, и спрямо контролната група (*p*<0.001) на 20-та и (*p*<0.05) на 30-та минута.

При *ChIS+L-NAME+N/OFQ(1-13)NH₂* групата се наблюдава статистически значимо понижение на болковия праг спрямо контролата и *ChIS* групата (*p*<0.001) за целия период на изследване.

При *ChIS+L-NAME+[Orn*⁹,*Orn*¹³*]* се наблюдава статистически значимо понижение на болковия праг спрямо контролата и *ChIS* групата на 10-та и 20-та минута (*p*<0.001).

Групата *ChIS+L-NAME+[Orn*⁹*]* статистически значимо понижи болковия праг спрямо *ChIS* (*p*<0.01) на 10-та минута. На 20-та минута се наблюдава статистически значимо повишение на болковия праг спрямо контролата (*p*<0.001), и спрямо *ChIS* (*p*<0.01). На 30-та минута болковия праг остава повишен, но без статистическа значима разлика (фиг. 26).



Фигура 26. Ефекти на L-NAME (10 mg/kg, i.p.) при съвместното му приложение с N/OFQ(1–13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] върху болковия праг след ChIS. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.; **p*<0.05; ****p*<0.001, спрямо контролата; ++*p*<0.001; +++*p*<0.001, спрямо ChIS.

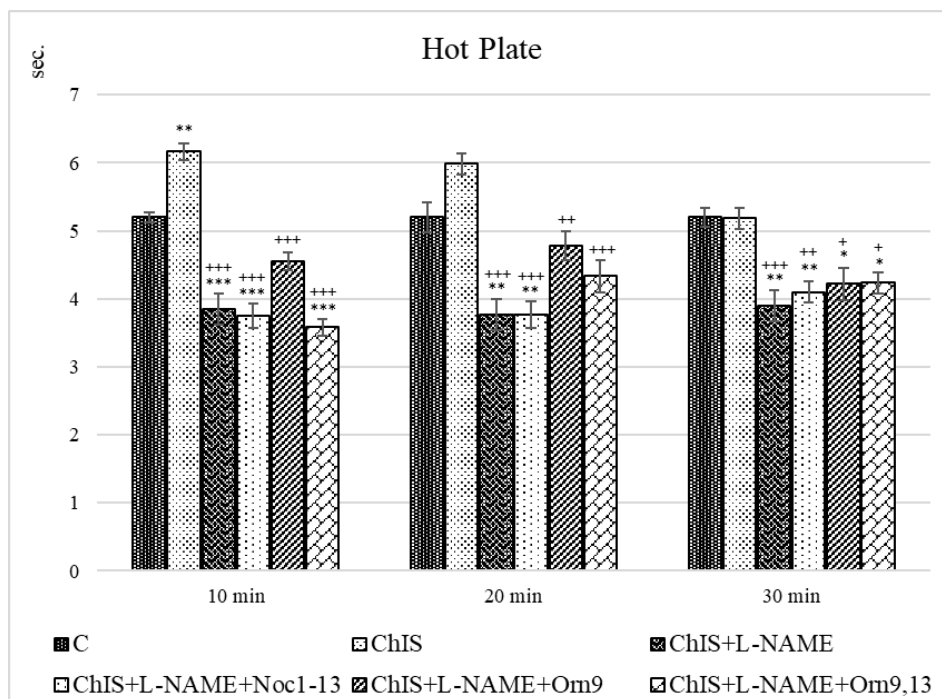
Hot Plate тест

L-NAME след стреса води до статистически значимо скъсяване на латентното време спрямо контролната група (*p*<0.001, на 10-та и *p*<0.01, на 20-та и 30-та минута) и спрямо ChIS групата (*p*<0.001) за целия период на изследването.

При комбинираното приложение на L-NAME с N/OFQ(1-13)NH₂ се наблюдава статистически значимо скъсено латентното време, спрямо контролата (*p*<0.001, 10-та мин.; *p*<0.01, на 20-та и на 30-та мин.), и спрямо ChIS (*p*<0.001, 10-та и 20-та мин.; *p*<0.01, на 30-та мин.).

При групата ChIS+L-NAME+[Orn⁹] се наблюдава статистически значимо скъсено латентното време, спрямо ChIS (*p*<0.001, 10-та мин.; *p*<0.01, 20-та мин.; *p*<0.05, 30-та мин.). Спрямо контролната група се наблюдава статистически значимо скъсено латентното време (*p*<0.05), на 30-та минута.

При ChIS+L-NAME+[Orn⁹,Orn¹³] се наблюдава статистически значимо скъсено латентно време, спрямо ChIS (*p*<0.001, на 10-та и 20-та мин.; *p*<0.05, на 30-та мин.), и спрямо контролата (*p*<0.001, на 10-та мин.; *p*<0.05, на 30-та мин.) (фиг. 27).



Фигура 27. Ефекти на L-NAME (10 mg/kg, i.p.) при съвместното му приложение с N/OFQ(1–13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] върху HP-латентността след ChIS. Данните са представени като средни стойности ± S.E.M.; **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001, спрямо контролата; +*p*<0.05; ++*p*<0.001; +++*p*<0.001, спрямо ChIS.

4.3. Обсъждане

Изучаване влиянието на азотноокисната система върху аналгетичните ефекти на ноцицептин N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] при животни подложени на остър и хроничен имобилизационен стрес, чрез L-NAME (инхибитор на NOS) и L-arg (прекурсор на NO).

- Азотният оксид (NO) е невромедиатор, който участва в регулацията на болката както на централно, така и на периферно ниво. NO модулира активността на PAG и RVM, ключови структури в низходящия инхибиторен контрол на болката. При стрес NO участва в модулацията на ендогенните аналгетични механизми, включително чрез взаимодействие с опиоидни и NOP-рецептори. L-arginin и SIN-1 (донор на NO) индуцират антиноцицепция, медирана от динорфиновата система, което подчертава антиноцицептивния потенциал на NO в условия на стрес.

Резултатите от нашето изследване показват, че прилагането на L-arg след остър стрес води до повишаване на болковия праг в PP теста (*p*<0.001 на 10-та и 20-та мин. и *p*<0.01 на 30-та мин., спрямо контролата и *p*<0.05 на 10-та мин. и *p*<0.001 на 20-та мин., спрямо 1hIS групата) и удължаване на латентното време в HP теста (*p*<0.001, спрямо контролата и 1hIS), което показва, че L-arg увеличава SIA (фиг. 20 и 21).

Прилагането на L-NAME след стреса статистически значимо понижава болковия праг ($p < 0.001$ спрямо 1hIS) и скъсява латентното време ($p < 0.001$ спрямо 1hIS и $p < 0.01$ на 10-та мин. и $p < 0.001$ на 20-та и 30-та мин., спрямо контролата), което показва, че инхибитора на NOS намалява SIA (фиг. 22 и 23).

Комбинираното приложение на L-arg с N/OFQ(1–13)NH₂ и аналозите статистически значимо понижава болковия праг ($p < 0.001$, PP тест) и скъсява латентното време ($p < 0.001$, HP тест), като намалява SIA. В HP теста тези промени са по-изразени, като латентното време се скъсява спрямо контролната група ($p < 0.001$), което води до хипералгезия (фиг. 20 и 21).

При съвместното приложение на L-NAME с N/OFQ(1–13)NH₂ и аналозите след стреса се наблюдава статистически значимо понижаване на болковия праг ($p < 0.001$, спрямо 1hIS) и скъсяване на латентното време ($p < 0.001$, спрямо 1hIS), което води до потискане на SIA. В HP теста латентното време допълнително се скъсява под нивото на контролната група ($p < 0.001$), като предизвиква хипералгезия (фиг. 22 и 23).

Данни на Xu et al. показват, че N/OFQ активира невроналната азотноокисна синтаза (чрез Ca²⁺-зависима активация на nNOS) в гръбначния мозък, като по този начин стимулира локално производство на NO. N/OFQ-индуцираната проноцицепция частично се медира чрез NO/cGMP пътя – механизъм, който би могъл да обясни наблюдаваното понижаване на болковия праг и скъсяване на латентното време.

Понижаването на болковият праг и скъсяването на латентното време при съвместното въвеждане на N/OFQ(1–13)NH₂ и аналозите с L-arg, както и тяхното ко-приложение с инхибитора на NOS, след 1hIS показват, че активирането на NOP рецепторите в условия на променена NO активност, води до хипералгезия. Това е в съответствие с данните на Janicki & Jeske-Janicka и Cury et al., които описват проноцицептивната роля на NO при стрес-индуцирана активация на iNOS. Допълнително, Freire et al. подчертават, че NOP рецепторите взаимодействат с NO/cGMP сигнализацията, което предполага, че нарушаването на този път чрез фармакологична интервенция или стрес-индуцирана експресия може да промени ефекта на NOP активирането от аналгетичен към проноцицептивен. В условия на остър стрес, както показват Srebro et al., NMDA-медираната хипералгезия се усилва от NO, което допълнително обяснява наблюдаваните резултати.

Данните от предишни наши изследвания показат, че N/OFQ(1–13)NH₂ и аналозите – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] приложени съвместно с L-arginine или L-NAME, след студов стрес потискат SIA, като значимо понижават болковия праг в PP теста. Подобни резултати са докладвани от изследване на други опиоидни пептиди (аналози на Tyr-MIF-1), приложени

след остър имобилизационен стрес, които водят до намаляване на SIA, като ефектът се модулира от L-arginine и L-NAME.

На базата на литературните данни и резултатите от нашето изследване може да се заключи, че азотният оксид участва в модулацията на SIA, предизвикана от остър имобилизационен стрес. Повишаването на синтеза на NO чрез L-arginine увеличава SIA, докато инхибирането и чрез L-NAME я понижава. Това показва, че NO е ключов модулатор в ендогенните антиноцицептивни механизми, активирани при остър стрес. Взаимодействието на NO с ноцицептин и аналозите след остър 1hIS намалява техния аналгетичен ефект, като увеличава болковата чувствителност и потиска SIA.

- Резултатите от настоящото изследване показват, че самостоятелното приложение на L-arg непосредствено след ChIS, води до статистически значимо повишаване на болковия праг спрямо контролната група ($p < 0.001$) за целия период на изследването и спрямо ChIS групата ($p < 0.01$, на 10-та мин.; $p < 0.001$ на 20-та и 30-та мин.). Най-висок праг бе отчетен на 20-та минута от PP теста ($192.3 \pm 6.9 \text{ g/cm}^2$). В HP теста се наблюдава статистически значимо удължаване на латентното време спрямо контролата ($p < 0.001$) за целия период на изследването и спрямо ChIS ($p < 0.001$) на 20-та и 30-та минута. Резултатите показват, че L-arg предизвиква аналгезия при хроничен стрес (фиг. 24 и 25). На фона на L-arg, N/OFQ(1–13)NH₂ и неговите аналози понижават болковия праг и статистически значимо скъсяват латентното време както спрямо ChIS ($p < 0.001$), така и спрямо контролната група ($p < 0.001$) на 10-та и 20-та минута, което води до хипералгезия (фиг. 24 и 25).

Интерес представляват пептид-специфичните и времево зависими ефекти, наблюдавани при съвместното приложение на L-arg с аналозите. В PP теста се отчита повишаване на болковия праг на 20-та минута при [Orn⁹, Orn¹³] и на 30-та минута при [Orn⁹] ($p < 0.01$ спрямо контролата), което контрастира с общото понижение на прага. Това предполага, че структурните модификации в пептидната последователност оказват влияние върху активността, продължителността на действие и взаимодействието с NO.

В този контекст, включването на орнитин в пептидната структура придобива допълнително значение, предвид метаболитната връзка между орнитин и аргинин. Орнитинът не е директен субстрат за NOS, но участва в урея цикъла, където е в динамичен баланс с аргинина. Аргининът се разгражда до орнитин и урея чрез действието на аргиназа, а орнитинът може да се използва за възстановяване на аргинин чрез синтеза на цитрулин, който впоследствие се рециклира обратно до аргинин. Това равновесие между орнитин и аргинин е ключов регулатор на NO продукцията.

Изследването на Marini et al. показва, че ентералната аргиназа II осигурява орнитин за синтеза на цитрулин, подчертавайки взаимовръзката между тези аминокиселини в азотния метаболизъм и NO сигнализацията. Следователно, аналгетичните ефекти, наблюдавани при $[\text{Orn}^9]$ и $[\text{Orn}^9, \text{Orn}^{13}]$, могат да бъдат резултат не само от структурната модификация на пептида, но и на влиянието върху локалния аргинин/орнитин баланс, който регулира NO продукцията с последващо отражение върху болковата модулация.

Хроничният стрес води до биохимични и неврофизиологични промени, които засягат болковата чувствителност, включително регулацията NOS и модулацията на NOP рецепторната система. NO може да действа антиноцицептивно, като активира NO/cGMP сигнализация, потиска глутаматергични и субстанция Р-медиирани пътища, и усилва ефектите на ендогенни и екзогенни опиоиди. В същото време, NO взаимодейства с NOP рецепторите, като модулира G-протеин-свързани пътища и вторични посредници като cGMP. При хроничен стрес се наблюдава повишена експресия на iNOS, което води до свръхпродукция на NO и проноцицептивни ефекти. Това може да обясни хипералгезията, наблюдавана при приложение на N/OFQ аналози в условия на стрес.

Регионално специфичната регулация на NOS изоформите, описана от Gądek-Michalska et al., предполага, че ефектите на NO върху болковата чувствителност са контекстуално зависими, т.е. зависят от вида на стреса, локализацията на действието и взаимодействието с други невромедиатори.

При хроничен стрес взаимодействието между азотноокисната и ноцицептиновата системи придобива особено значение. Повишената експресия на iNOS и свръхпродукцията на NO могат да променят ефектите на NOP рецепторната активация, като водят до хипералгезия или модулират антиноцицептивни механизми. Съвместното приложение на L-arg и структурно модифицирани аналози на N/OFQ(1–13)NH₂ показва, че NO може да влияе върху продължителността и интензитета на пептид-медиираните ефекти, което подчертава ролята на NO като ключов модулатор на болката и ноцицептинергичната система при стрес.

Приложението на L-NAME след ChIS статистически значимо понижава болковия праг в PP теста спрямо ChIS групата за целия период на изследването ($p < 0.001$), както и спрямо контролната група на 20-та ($p < 0.001$) и 30-та минута ($p < 0.05$). В HP теста се отчита статистически значимо скъсяване на латентното време спрямо контролната група на 10-та мин. ($p < 0.001$), на 20-та и 30-та минута ($p < 0.01$), както и спрямо ChIS групата за целия период на изследването ($p < 0.001$). Тези резултати показват, че инхибирането на NO синтеза води до загуба на антиноцицептивния ефект, индуциран от стреса и до хипералгезия (фиг. 26 и 27). Съвместното приложение на L-NAME с N/OFQ(1–13)NH₂ и неговите аналози води до статистически значимо понижение на болковия праг и

скъсяване на латентното време спрямо ChIS и контролната група ($p < 0.01$; $p < 0.001$). Наблюдаваната хипералгезия показва, че инхибирането на NO синтезата блокира антиноцицептивните механизми, активирани от хроничния стрес и потенциално усилва проноцицептивните ефекти на ноцицептиновите пептиди (фиг. 26 и 27). Изключение се наблюдава при групата L-NAME + [Orn⁹], където на 20-та минута се отчита статистически значимо повишаване на болковия праг спрямо контролата ($p < 0.001$) и спрямо ChIS ($p < 0.01$), което се запазва и на 30-та минута, макар и без статистическа значимост (фиг. 26). Това предполага, че [Orn⁹] може да активира допълнителни антиноцицептивни механизми независими от NO или да влияе върху локалния метаболитен баланс между орнитин и аргинин с потенциално въздействие върху други сигнални системи.

Взаимодействието между NO и ноцицептиновата система при хроничен стрес е комплексно и контекстуално зависимо. NOP рецепторите, активирани от N/OFQ могат да индуцират продукцията на NO чрез активиране на nNOS, особено в гръбначния мозък. NO участва в антиноцицептивни механизми чрез cGMP-медирана сигнализация, която потенциално усилва ефектите на NOP активацията. Инхибирането на NOS чрез L-NAME прекъсва тази сигнална каскада, което води до загуба на антиноцицептивния ефект и засилване на хипералгезията. Това би могло да обясни наблюдаваните резултати при съвместното приложение на L-NAME с N/OFQ аналози, при които се отчита понижаване на болковия праг и скъсяване на латентното време.

5. Ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] върху серумните нива на АСТН, кортизол и адреналин при остър и хроничен имобилизационен стрес.

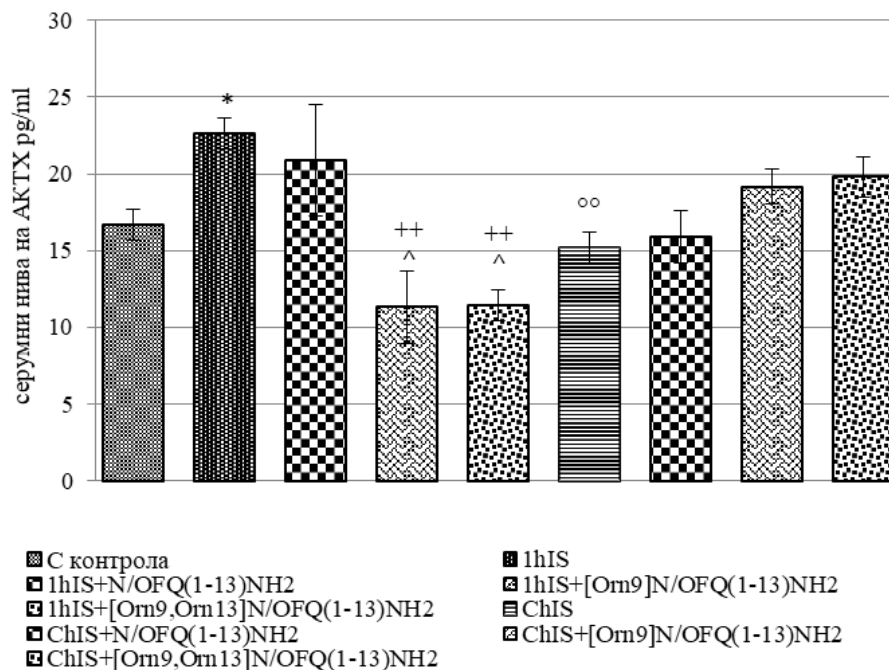
5.1. серумни нива на АСТН

Острият имобилизационен стрес статистически значимо повишава серумните нива на АСТН ($p < 0.05$) спрямо контролната група (22.65 ± 2.15 pg/ml спрямо 16.65 ± 2.35 pg/ml).

N/OFQ(1-13)NH₂ след стреса понижава нивата на АСТН спрямо 1hIS, но без статистически значима разлика, спрямо контролата нивата на АСТН остават по-високи. Аналозите [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] статистически значимо понижават нивата на АСТН ($p < 0.01$) спрямо 1hIS групата.

При ChIS нивата на АСТН са близки до контролата (15.16 ± 1.96 pg/ml) и статистически значимо по-ниски ($p < 0.01$) спрямо 1hIS.

При N/OFQ(1-13)NH₂ серумните нива на АСТН са съизмерими с тези на ChIS групата. При [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] се наблюдава повишаване на нивата на АСТН спрямо ChIS и контролата, но без статистически значими разлики (фиг. 28).



Фигура 28. Серумни нива на АСТН при животни подложени на 1hIS и ChIS и след приложението на N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹, Orn¹³]. Данните са представени като средни стойности $\pm$ S.E.M.; * p <0.05, спрямо контролата; ++ p <0.01, спрямо 1hIS; oo p <0.01 между 1hIS и ChIS.

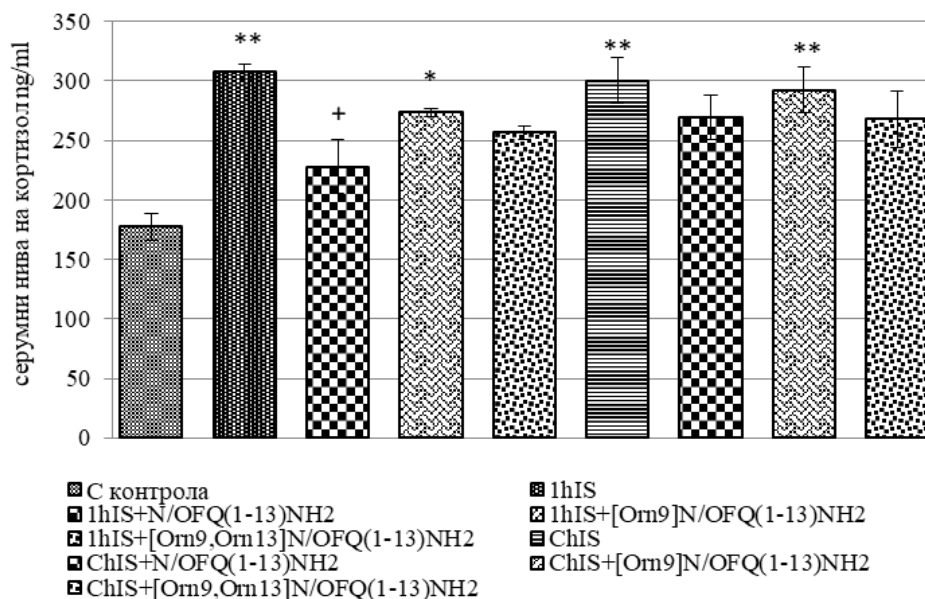
5.2. серумни нива на кортизол

1hIS статистически значимо повишава серумните нива на кортизола спрямо контролната група (p <0.01).

Приложението на N/OFQ(1-13)NH₂ след 1hIS статистически значимо понижава нивата на кортизол (p <0.05) спрямо 1hIS, (228.1 ± 22.7 ng/ml спрямо 308.2 ± 6.07 ng/ml), което предполага инхибиторен ефект на пептида върху НРА активация. Аналогът [Orn⁹] понижава нивата на кортизола спрямо 1hIS и статистически значимо ги повишава спрямо контролната група (p <0.05). Аналогът [Orn⁹, Orn¹³] понижива нивата на кортизола спрямо 1hIS, но без статистически значима разлика.

При ChIS се наблюдава статистически значимо повишаване на нивата на кортизола (p <0.01) спрямо контролата (300 ± 19.24 ng/ml спрямо 177.36 ± 11.2 ng/ml).

N/OFQ(1-13)NH₂ и аналозите след хроничния стрес понижават нивата на кортизола спрямо ChIS, но без значима разлика. При [Orn⁹] се наблюдава статистически значимо повишаване на нивата на кортизола (p <0.01) спрямо контролната група (фиг. 29).



Фигура 29. Серумни нива на кортизол при животни подложени на 1hIS и ChIS, и след приложението на N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹, Orn¹³]. Данните са представени като средни стойности $\pm$ S.E.M.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контролата; + $p < 0.01$, спрямо 1hIS.

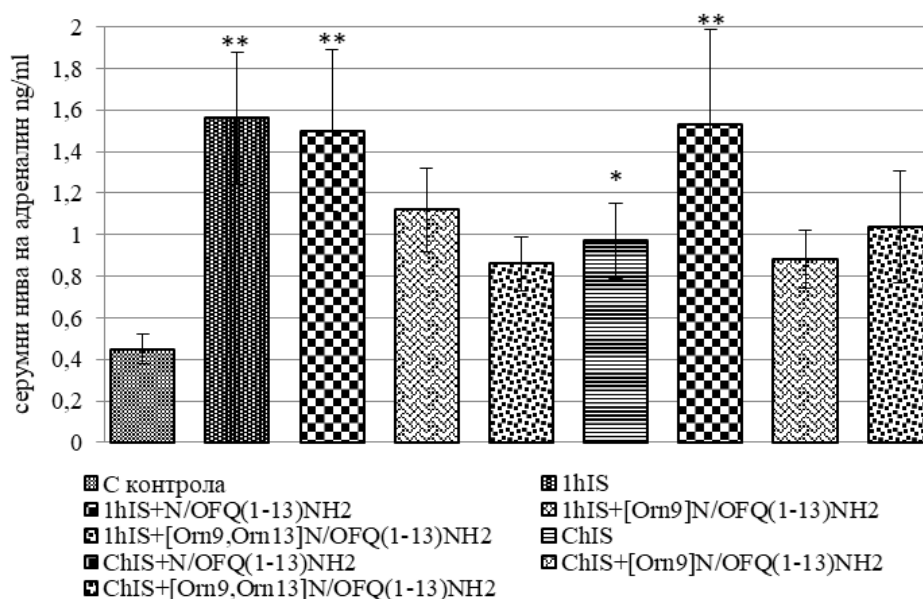
5.3. серумни нива на адреналин

1hIS статистически значимо повишава серумните нива на адреналина ($p < 0.01$) спрямо контролната група (1.56 ± 0.32 спрямо 0.45 ± 0.07 ng/ml).

Приложението на N/OFQ(1-13)NH₂ след 1hIS статистически значимо повишава нивата на адреналина спрямо контролата ($p < 0.01$). Аналозите [Orn⁹] и [Orn⁹, Orn¹³] понижават нивата на адреналина спрямо 1hIS без статистически значима разлика, докато спрямо контролата нивата остават по-високи.

При ChIS се наблюдава статистически значимо повишение на адреналина ($p < 0.05$) спрямо контролата, (0.97 ± 0.18 спрямо 0.45 ± 0.07 ng/ml).

Приложението на N/OFQ(1-13)NH₂ след хроничния стрес води до статистически значимо повишаване на нивата на адреналина ($p < 0.01$) спрямо контролата, като стойностите са по-високи и спрямо ChIS групата. Аналогът [Orn⁹] понижават нивата на адреналина спрямо ChIS и ги повишава спрямо контролата. Аналогът [Orn⁹, Orn¹³] след хроничния стрес повишава серумните нива на адреналина спрямо контролата, като амплитудата на отговора е съизмерим с този на ChIS групата (фиг. 30).



Фигура 30. Серумни нива на адреналин при животни подложени на 1hIS и ChIS и след приложението на N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³]. Данните са представени като средни стойности $\pm$ S.E.M.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контролата.

5.4. Обсъждане

Ноцицептиновата система играе съществена роля в регулацията на НРА-оста и в модулацията на невроендокринния отговор при стрес. Невроните, експресиращи NOP-рецептори, са локализирани в хипоталамуса, амигдалата и други лимбични структури, които участват активно в координирането на хормоналния отговор при стресови стимули. Централното активиране на NOP рецептора стимулира освобождаването на CRH и глюкокортикоиди, особено при остър стрес, което води до активация на НРА-оста и повишени нива на АСТН и кортизол.

Получените от нас резултати показват, че 1hIS води до статистически значимо повишение на серумните нива на АСТН ($p < 0.05$), кортизола ($p < 0.01$) и адреналина ($p < 0.01$) спрямо контролата, което е в съответствие с добре документираната активация на SAM и НРА-оста при стрес. Това повишение отразява физиологичната нужда от мобилизация на енергийните ресурси и поддържане на хомеостазата чрез катехоламиново и глюкокортикоидно освобождаване при стрес.

Серумните нива на АСТН показват характерна динамика в отговор на 1hIS и ChIS, както и при приложението на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите аналози. При 1hIS се наблюдава статистически значимо повишение на АСТН ($p < 0.05$) спрямо контролната група (22.65 ± 2.15 pg/ml спрямо 16.65 ± 2.35 pg/ml), което потвърждава активирането на НРА оста и CRH-секретиращите неврони в PVN на хипоталамуса и последващата стимулация на аденохипофизата. Приложението на N/OFQ(1-13)NH₂ след

остър стрес води до незначително понижение на АСТН спрямо 1hIS, което предполага ограничен инхибиторен ефект на пептида върху хормоналната секреция. За разлика от него, аналозите [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] предизвикват значително понижение на АСТН спрямо 1hIS ($p<0.01$), което показва посилен инхибиторен ефект. Това вероятно се дължи на повишен афинитет към NOP рецептора и подобрена биостабилност на модифицираните пептиди. При хроничен стрес нивата на АСТН са понижени спрямо 1hIS ($p<0.01$), което вероятно отразява адаптационни механизми на НРА-оста и намалена чувствителност към продължителна стресова експозиция. Приложението на [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] предизвиква слабо повишение на АСТН спрямо ChIS, докато при N/OFQ(1-13)NH₂ стойностите са съизмерими с тези на ChIS (фиг. 28).

При 1hIS се наблюдава статистически значимо повишение на серумните нива на кортизола ($p<0.01$) спрямо контролната група (308.2 ± 6.07 ng/ml спрямо 177.36 ± 11.2 ng/ml), което потвърждава ендокринна реакция към интензивен стресов стимул. Това е в съответствие с литературните данни, които описват активацията на НРА с последващата секреция на глюкокортикоиди от надбъбречната кора.

Приложението на N/OFQ(1-13)NH₂ след остър стрес води до статистически значимо понижение на кортизола ($p<0.05$) спрямо 1hIS, (228.1 ± 22.7 ng/ml спрямо 308.2 ± 6.07 ng/ml), което показва инхибиторен ефект на пептида върху НРА-активацията. Това съответства на наблюденията на Ubaldi et al., които описват ролята на ноцицептиновата система в ограничаването на хормоналния отговор към стрес чрез взаимодействие с NOP-рецепторите. Аналогът [Orn⁹] статистически значимо повишава нивата на кортизола спрямо контролата ($p<0.05$), докато спрямо 1hIS ги понижава (273.7 ± 3.32 ng/ml спрямо 308.2 ± 6.07 ng/ml). [Orn⁹,Orn¹³] също понижава нивата на кортизола спрямо 1hIS (256.4 ± 5.5 ng/ml спрямо 308.2 ± 6.07 ng/ml). Данните свидетелстват за инхибиторен ефект на аналозите върху кортизоловите нива при остър стрес, който е по-слаб в сравнение с този на ноцицептина.

При ChIS се наблюдава статистически значимо повишение на кортизола ($p<0.01$) спрямо контролата (300 ± 19.24 ng/ml спрямо 177.36 ± 11.2 ng/ml), което отразява продължителна активация на НРА-оста и е в съответствие с описаните адаптационни механизми при продължителна експозиция на стрес. Приложението на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹,Orn¹³] води до понижаване на нивата на кортизола спрямо ChIS, но без статистическа разлика. Аналогът [Orn⁹] статистически значимо повишава нивата на кортизола спрямо контролата ($p<0.01$), като амплитудата на отговора е съизмерима с тази на ChIS, което предполага, че инхибиторния ефект на пептидите е по-слаб при хроничен стрес (фиг. 29).

Резултатите показват, че ноцицептиновата система участва в регулацията на кортизоловата секреция, като инхибиторният ефект на пептидите, особено на N/OFQ(1-13)NH₂ е по-изразен при остър стрес.

Получените от нас резултати показват, че както 1hIS, така и ChIS водят до статистически значимо повишение на серумните нива на адреналина ($p < 0.01$) спрямо контролата, което е в съответствие с активацията на SAM при стрес.

Приложението на N/OFQ(1-13)NH₂ след 1hIS и ChIS води до статистически значимо повишаване на серумните нива адреналина ($p < 0.01$) спрямо контролата. Това наблюдение е в съответствие с данни, че ноцицептина може да има двойствен ефект върху стрес реакцията, в зависимост от дозата, времето на приложение и типа на стреса.

От особено значение са резултатите при приложението на аналозите [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³], които понижават нивата на адреналина спрямо 1hIS. Това показва, че структурните модификации в позициите 9 и 13 усилват антистресорната активност на пептида, вероятно чрез повишен афинитет към NOP-рецептора или подобрена стабилност в серумна среда. По-силният инхибиторен ефект на [Orn⁹,Orn¹³] при остър стрес предполага синергизъм между двете модификации в пептида. При [Orn⁹] нивата на адреналина са по-високи спрямо контролата, но по-ниски от ChIS, а при ChIS + [Orn⁹,Orn¹³] се наблюдава повишение спрямо контролата и близки стойности до ChIS. Това показва, че [Orn⁹] има по-изразен инхибиторен ефект върху симпатoadреномедуларната активация при хроничен стрес (фиг. 30).

Наблюдаваното отслабване на инхибиторния ефект на [Orn⁹,Orn¹³] върху нивата на адреналина при ChIS може да се обясни с адаптационни механизми на HPA и SAM при продължителна експозиция на стрес. Според McEwen, хроничният стрес води до невроендокринна адаптация, включваща промени в чувствителността към регулаторни пептиди, което може да намали техния ефект. Продължителният стрес може да индуцира десенситизация или промени в експресията на NOP-рецепторите, което би ограничило способността на аналозите да упражняват своя ефект.

Допълнителна подкрепа за участието на ноцицептиновата система в регулацията на хормоналния отговор към стрес предоставят редица експериментални проучвания. Според Mallimo & Kusnesov централното приложение на N/OFQ води до активация на HPA-оста, като антагонизмът или генетичният дефицит на NOP рецептора предизвикват повишена секреция на АСТН и кортикостерон в отговор на стрес. Това предполага, че ендегенната N/OFQ система играе роля в ограничаването на хормоналната реакция при стрес, като поддържа невроендокринната хомеостаза.

Сходни резултати са докладвани от Leggett et al., които установяват, че блокирането на NOP рецептора при модели на възпалителен стрес води

до повишени нива на АСТН и кортикостерон. Авторите изразяват хипотезата, че ендогенната N/OFQ система функционира като модулатор, който ограничава прекомерната активация на НРА-оста в условия на физиологичен или патологичен стрес.

Delaney et al. доказват, че централната блокада на NOP рецептора води до повишена експресия на CRF и POMC, както и до увеличена секреция на кортикостерон. Тези резултати потвърждават, че NOP рецепторната система участва активно в модулацията на хормоналния отговор при остър и хроничен стрес, като влияе върху ключови компоненти на НРА-оста.

Интересно е, че антагонистите на NOP-рецептора, като SB-612111, проявяват анксиолитичен и антидепресивен ефект, като потискат хормоналния отговор към стрес и намаляват секрецията на CRH и глюкокортикоиди. Това подкрепя хипотезата за двупосочния ефект на ноцицептиновата система, от една страна, тя може да усилва реакцията при остър стрес, а от друга, да ограничи прекомерната активация на НРА-оста при хронични или патологични състояния.

Наблюдаваните в настоящото изследване ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите аналози върху серумните нива на АСТН, кортизол и адреналин подкрепят хипотезата за двупосочната роля на ноцицептиновата система, като усилваща или ограничаваща хормоналния отговор при стрес в зависимост от вида на стреса, рецепторната експресия и структурните характеристики на лиганда.

ИЗВОДИ

1. Ноцицептин и аналозите – [Orn⁹] и [Orn⁹,Orn¹³] статистически значимо повишават болковия праг и удължават латентното време, като индуцират аналгезия при интактни животни. Най-силен аналгетичен ефект проявява аналогът [Orn⁹,Orn¹³].
2. Острият и хроничният имобилизационен стрес индуцират SIA, която е по-изразена при остър стрес. Прилагането на ноцицептин и аналозите след остър стрес антагонизира SIA, като понижава болковия праг и скъсява латентното време спрямо групата, подложена на стрес, докато при хроничен стрес горепосочените промени са спрямо стреса и контролната група.
3. При интактни животни селективният антагонист JTC-801 повишава болковия праг и удължава латентното време спрямо контролата. При претретиране с JTC-801 значително се потиска аналгетичният ефект на всички изследвани пептиди в РР теста, а в НР теста блокадата води до хипералгезия.
4. Съвместното приложение на JTC-801 с пептидите води до статистически значимо понижаване на болковия праг и на аналгезията, индуцирана както от остър, така и от хроничен стрес. При остър стрес се наблюдава скъсяване на латентното време при [Orn⁹], а при хроничен стрес при всички пептиди спрямо контролата, което е съпроводено с развитие на хипералгезия.
5. При интактни животни налоксон статистически значимо понижава болковия праг и скъсява латентното време спрямо контролата, което води до хипералгезия. Съвместното приложение на налоксон с пептидите статистически значимо повишава болковия праг и удължава латентното време на 10-та минута спрямо контролата, по-изразено при аналозите.
6. При остър и хроничен стрес съвместното приложение на налоксон с пептидите статистически значимо понижава болковия праг и аналгезията индуцирана от стреса, и скъсява латентното време спрямо контролата, като предизвиква хипералгезия.
7. Съвместното приложение на L-arginine с пептидите при интактни животни статистически значимо повишава болковия праг и удължава латентното време спрямо L-arginine, най-изразено на 10-та минута в двата теста. Комбинирането на L-NAME с пептидите води до значимо повишаване на болковия праг и латентното време спрямо L-NAME и контролата, като амплитудата на отговорите е по-ниска в сравнение с тази на фона на L-arginine.

8. При остър и хроничен стрес L-arginine статистически значимо повишава болковия праг и удължава латентното време спрямо групата, подложена на стрес. Комбинираното приложение на L-arginine с ноцицептин и аналозите при остър и хроничен стрес стрес намалява SIA (понижава болковия праг) и скъсява латентното време спрямо контролната група в НР теста (причинява хипералгезия).
9. При остър стрес L-NAME намалява SIA (понижава болковия праг) и скъсява латентното време спрямо контролната група в НР теста (причинява хипералгезия). При хроничен стрес L-NAME предизвиква хипералгезия и в двата теста, като статистически значимо понижава болковия праг и скъсява латентното време спрямо контролната група.
10. При остър стрес съвместното приложение на L-NAME с пептидите намалява SIA (понижава болковия праг) и скъсява латентното време спрямо контролната група в НР теста (причинява хипералгезия), докато при хроничен стрес хипералгезия се наблюдава и в двата ноцицептивни теста. Изключение прави аналогът [Orn⁹], който на 20-та минута статистически значимо повишава болковия праг спрямо контролната група и групата подложена на хроничен стрес.
11. Острият стрес повишава серумните нива на АСТН, кортизол и адреналин спрямо контролната група, докато хроничният стрес води до повишаване на нивата на кортизол и адреналин без съществена промяна в АСТН спрямо контролната група. Сравнено с острия стрес, хроничният се характеризира с по-ниски нива на АСТН и адреналин и съизмерими концентрации на кортизол.
12. При остър стрес аналозите статистически значимо понижават серумните нива на АСТН спрямо контролната група и групата, подложена на стрес, докато при хроничен стрес ги повишават. И при двата модела на стрес пептидите понижават нивата на кортизола.
13. При остър и хроничен стрес ноцицептинът статистически значимо повишава серумните нива на адреналина спрямо контролната група. Аналозите понижават нивата на адреналина при остър стрес.

ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер

1. Сравнени са аналгетичните ефекти на новосинтезирани аналози на ноцицептин $N/OFQ(1-13)NH_2$ – $[Orn^9]N/OFQ(1-13)NH_2$ и $[Orn^9, Orn^{13}]N/OFQ(1-13)NH_2$ при интактни животни.
2. За първи път са изследвани ефектите на новосинтезирани аналози на ноцицептин $N/OFQ(1-13)NH_2$ – $[Orn^9]N/OFQ(1-13)NH_2$ и $[Orn^9, Orn^{13}]N/OFQ(1-13)NH_2$ върху SIA, предизвикана от остър и хроничен имобилизационен стрес.
3. За първи път са изследвани съвместните ефекти на JTC-801 с ноцицептин или с новосинтезираните аналози при интактни животни и върху SIA, предизвикана от остър и хроничен имобилизационен стрес.
4. За първи път са изследвани съвместните ефекти на налоксон с ноцицептин или с новосинтезираните аналози при интактни животни и върху SIA, предизвикана от остър и хроничен имобилизационен стрес.
5. За първи път са изследвани съвместните ефекти на L-arginine с ноцицептин или с новосинтезираните аналози при интактни животни и върху SIA, предизвикана от остър и хроничен имобилизационен стрес.
6. За първи път са изследвани съвместните ефекти на L-NAME с ноцицептин или с новосинтезираните аналози при интактни животни и върху SIA, предизвикана от остър и хроничен имобилизационен стрес.
7. За първи път са изследвани ефектите на ноцицептин и новосинтезираните аналози върху серумните нива на АСТН, кортизол и адреналин при остър и хроничен имобилизационен стрес.

СПИСЪК НА ПРОЕКТИ, ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации и доклади в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни (Scopus и Web of science)

1. **Himcheva I**, Stavreva GT, Naydenova E, Bocheva A. Involvement of the opioidergic and nociceptinergic systems in the analgesic effects of novel nociceptin analogues after acute and chronic immobilization stress. *Pharmacia*. 2022 Jun 10;69(4):935-42. ISSN: 0428-0296 SJR 0.212, IF 1.1 Scopus и Web of science

Списък на публикациите в научни издания, които не са реферирани и индексирани, вкл. пълнотекстови публикации (с книгопис и резюме) от проведен научен форум

1. **Химчева И**, Ставрева Г, Ангелова Н, Найденова Е, Кръстев Д, Кочев Д, Бочева А. Участие на опиоидергичната система в аналгетичните ефекти на новосинтезирани ноцицептинови аналози при имобилизационен стрес. *Здраве и Наука*. 2020, бр.1-2, стр. 41- 44. ISSN 1314-3360.
2. **Химчева И**, Ставрева Г, Симеонова Т, Ангелова Н, Найденова Е, Кръстев Д, Кочев Д, Бочева А. Ефекти на ноцицептин и аналози върху болковата перцепция след топлинен стрес при плъхове. *Здраве и Наука*. 2020, бр.1-2, стр. 36-40. ISSN 1314-3360
3. Бочева А, А. Кастелова, **И. Химчева**, А. Димитрова, А. Григориан, Н. Кръстев, М. Калниев, Д. Кръстев. Биологично активни пептиди: концепции. *Здраве и Наука* 2022, бр. 3-4, стр. 18-22. ISSN 1314-3360
4. Кръстев Д, А. Кастелова, А. Димитрова, А. Григориан, Н. Кръстев, М. Калниев, **И. Химчева**, А. Бочева. Невропептиди: Невромодулаторната им роля в цнс при норма. *Здраве и Наука* 2022; бр.3-4, стр. 28-31. ISSN 1314-3360

Участия в научни прояви с доклад/постер, с публикувано резюме в сборник/списание от форума

1. **Himcheva I**, Nocheva HH, Pavlov ND, Naydenova ED, Bocheva AI. Involvement of Naloxone and JTC-801 in Analgesic Effects of Newly Synthesized Nociceptive Analogs. *JBCR*. Vol.12 Number 1,Supplement 2, 2019,127-128
2. **Himcheva I**, Angelova NG, Bocheva AI, Naydenova ED. Analgesic Effects and Synthesis of New Analogues of Nociceptin. *JBCR*. Vol.12 Number 1,Supplement 2, 2019,128

3. Krastev PK, **Himcheva I**, Dzhambazova EB, Stavreva GT, Lakova ET, Bocheva AI. Effects of Leu-Enkephalin Analogue on Stress-Induced Analgesia in Rats. JBCR. Vol.12 Number 1, Supplement 2, 2019, 123-124
4. N. Angelova, **I. Himcheva**, A. Bocheva, E. Naydenova. Synthesis and biological activity of nociceptin /OFQ(1–13)NH₂ analogues. XVI Научна постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти, 100 години международен съюз по чиста и приложна химия, Сборник с резюмета, ХТМУ- 23 май, 2019, VII-10, 124
5. N. Angelova, **I. Himcheva**, A. Bocheva, E. Naydenova. Synthesis and biological activity of nociceptin /OFQ(1–13)NH₂ analogues. VI-та Научна сесия за студенти, докторанти и млади учени ХТМУ- 7 ноември, 2019, София
6. **Химчева И**, Ставрева Г, Григорян А, Димитрова А, Бочева А. Участие на азотния оксид в аналгетичните ефекти на новосинтезирани ноцицептинови аналози след хроничен имобилизационен стрес. Юбилейна научна конференция „60 години Патопфизиология“ – Медицински университет – Варна " 24-25 септември 2021 г. (он-лайн)
7. **Himcheva I.**, G. Stavreva, N. Angelova, E. Naydenova, A. Bocheva. Involvement of the nitric oxydeergic system in the analgesic effects of newly synthesized nociceptin analogues after chronic immobilization stress. The EuroBiotech Journal DOI: 10.2478/ebtj-2021-0031, European Biotechnology Congress September 23-25, 2021 in Sofia, Bulgaria.
8. **Ivelina Himcheva**, Emilia Naydenova, Galiya Stavreva, Adriana Bocheva. Participation of the opioidergic and nociceptinergic systems in the effects of nociceptin and new analogues after acute and chronic immobilization stress. International Scientific Conference of the Bulgarian Peptide Society, e-Abstract book 2021; 46-48, 9th International Conference of Peptides (hybride), Velingrad, Bulgaria, 27.08 – 29.08.2021
9. **Химчева Ив.**, Ангелова Н., Ставрева Г., Найденова Е., Бочева А. Ноцицептин и нови аналози: Ефекти и механизми върху аналгезията след стрес. Национална среща за „Изграждане на научно изследователска мрежа“ Национална програма „Европейски научни мрежи“, „Drug-Molecule“, e-book 2021; 227-251, София, България, 30.06.2021
10. **Ivelina Himcheva**, Adriana Bocheva. Biological activity of some newly synthesized analogues of nociception. Ежегоден конкурс „Наука и Младост – 2022“, 08.04.-10.04.2022 МУ – Пловдив
11. **Ivelina Himcheva**, Galya Stavreva, Tatyana Simeonova, Anelia Dimitrova, Emilia Naydenova, Adriana Bocheva. Nociceptin and analogues: Involvement of the cannabinoidergic system on pain after chronic immobilization stress. national conference with international

- participation “Innovations in drug molecules”19-22 July, 2022; Hisarya, Bulgaria. P78-80.ISBN: 978-954-465-142-8
12. **Ivelina Himcheva**, Borislav Ignatov, Antonia Kastelova, Adriana Bocheva. Nociceptin and its role in opioid regulation in the brain, 12th SouthEast European Conference and 32st Annual Assembly of IMAB 20-23october 2022 Trakia University of Stara Zagora, Bulgaria
 13. Ademira Borisova, **Ivelina Himcheva**, Armine Grigoryan, Anelia Dimitrova, Adriana Bocheva. Are catecholaminergic neurotransmission and nociceptin analogues involved in chronic stress?, 12th South-East European Conference and 32st Annual Assembly of IMAB 20-23october 2022 Trakia University of Stara Zagora, Bulgaria
 14. **Ivelina Himcheva**, Galya Stavreva, Adriana Bocheva Role of nociceptin and analogues in the interaction between nitricoxidergic and endocannabinoidergic systems after chronic immobilization stress in rats, International Conference of the Bulgarian Society of Physiological Sciences; 2022 Oct 30 – Nov 1; Stara Zagora Mineral Springs, Bulgaria. Sofia: Elestra EOOD; 2022. p. 63-4. ISBN: 978-619-7292-23-7.
 15. **Himcheva I.**, G. Stavreva, A. Grigorian, A. Dimitrova, E. Naydenova, A. Bocheva Effects of nociceptin and analogues and the involvement of the nitricoxidergic system on nociception after chronic immobilization stress, International Conference of the Bulgarian Society of Physiological Sciences; 2022 Oct 30 – Nov 1; Stara Zagora Mineral Springs, Bulgaria. Sofia: Elestra EOOD; 2022. p. 70-1. ISBN: 978-619-7292-23-7.
 16. **Himcheva I.**, G. Stavreva, A. Borisova, A. Grigorian, A. Dimitrova, E. Naydenova, A. Bocheva, Effects of nociceptin and analogues on the cannabinoidergic system on pain after chronic immobilization stress, International Conference of the Bulgarian Society of Physiological Sciences; 2022 Oct 30 – Nov 1; Stara Zagora Mineral Springs, Bulgaria. Sofia: Elestra EOOD; 2022. p. 66-7. ISBN: 978-619-7292-23-7.
 17. **Himcheva I.**, T. Simeonova, E. Naydenova, G. Stavreva. Involvement of the opioid and endocannabinoid systems in the analgesic effects of novel nociceptin analogues after chronic immobilisation stress. Jubilee Scientific Conference “50 Years of Medical Education and Science in Pleven” 1-3.11.2024. Abstract book: p 184. ISBN: 978-954-756-347-6
 18. **Himcheva I.**, A. Borisova, A. Grigorian, G. Stavreva, A. Dimitrova. Effects of novel nociceptin analogues on the adrenergic and opioidergic systems after chronic immobilisation stress. Jubilee Scientific Conference “50 Years of Medical Education and Science in Pleven” 1-3.11.2024. Abstract book: p 183. ISBN: 978-954-756-347-6
 19. Галя Ставрева, **И. Химчева**, Е. Найденова. Аналози на ноцицептин и техните ефекти върху ендоканабиноидните и опиоидните системи след хроничен имобилизационен при плъхове.

VIII Национален конгрес по фармакология, клинична фармакология и терапия. Фармакологията от експеримента към клиниката. 15-17 ноември 2024, Медицински Университет-Плевен

Участия в научно-изследователски проекти

1. „Ноцицептин и новосинтезирани аналози: Ефекти и механизми на действие върху ноцицепцията при модел на хроничен стрес“, к-ра „Физиология и патофизиология“, МУ-Плевен проект №10/2020
2. „Биологичната активност на някои новосинтезирани аналози на ноцицептина“, катедра „Физиология и патофизиология“, МУ-Плевен, проект №19/2019
3. „Ефекти на ендоканабиноидната и азотно окисна система върху болковата перцепция и острата възпалителна болка при студова стрес-индуцирана аналгезия на плъх“, к-ра Патофизиология, МУ-София, проект №42/2014 г.