

ДО

ЗАМ.РЕКТОР НИД -

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - Плевен

С Т А Н О В И Щ Е

ОТ

проф. д-р ЮЛИЯ ГЕОРГИЕВА НИКОЛОВА, ДМ –

Катедра физиология на МФ, МУ – Пловдив

ОТНОСНО

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР” в професионално направление 7.1. Медицина, докторска програма ”Физиология на човека” на тема:

“ЕФЕКТИ НА НОВИ АНАЛОЗИ НА НОЦИЦЕПТИНА ВЪРХУ БОЛКОВАТА ПЕРЦЕПЦИЯ ПРИ ОСТЪР И ХРОНИЧЕН ИМОБИЛИЗАЦИОНЕН СТРЕС”.

Докторант: д-р ИВЕЛИНА ИВАНОВА ХИМЧЕВА

Научни ръководители: проф. д-р АДРИАНА БОЧЕВА, ДМ (†)

**проф. д-р ГАЛЯ СТАВРЕВА-
МАРИНОВА, ДМ, МУ- Плевен**

Стресът е състояние на комплекс от физиологични и психични промени, насочени към възстановяване на нарушената хомеостаза. През 30те години на 20ти век Ханс Селие определя стреса като Общ Адаптационен Синдром, реализиращ физиологичен отговор към заплахата в три фази: реакция на тревога, стадий на резистентност и стадий на изтощение. Независимо от природата на стресорите и продължителността им на действие – остро или хронично, организмът реагира чрез физиологични и поведенчески промени, осигуряващи адаптацията му: повишаване на възбудимостта, вниманието, когнитивната активност и бдителност, активиране на сърдечно-съдовата и дихателна системи, преразпределение на кръвотока към мозъка или напречно набраздените мускули в зависимост дали стреса е нервно-психически или физически, усилен клетъчен метаболизъм и повишаване на телесната температура, модулация на имунния отговор, редукция на апетита и половите функции. Адаптацията на организма за мобилизирането му при остър стрес се осъществява чрез интегрирана регулация, изградена на базата на функционалното взаимодействие между нервната, ендокринната и имунната системи. Неврофизиологичният отговор се реализира чрез активирането на симпатикoadреналната система и хипоталамо-хипофизо-адреналната ос. При хроничен стрес физиологичната цена на адаптацията обаче е свързана с персистираща симпатикова хиперактивност, хронична секреция на глюкокортикоиди, свръхактивиране на системата ренин-ангиотензин-алдостерон, имуносупресия и поведенчески прояви на депресия и тревожност.

Докторантът д-р Ивелина Химчева е фокусирала научните си дирения към болковата перцепция при остър и хроничен стрес поради:

- модулиращото краткосрочно и дългосрочно участие на неuropeптидите в т.н. стрес индуцирана аналгезия, и конкретно

ролята на опиоидите - енкефалини, ендорфини, динарфини и специално на ноцицептин/орфанин(N/OFQ);

- независимия и отличаващ се във функцията си комплекс ноцицептин/орфанин-ноцицептинов рецептор (N/OFQ/NOP) чрез участието му в контрола на хроничната болка и тревожността;

- ключовата роля на мезолимбичната и мезокортикалната допаминергични системи в мотивационните процеси, възнаграждението и емоционалната оценка на напрежението в хода на адаптивното поведение.

Съвременното невробиологично разбиране за стрес индуцираната аналгезия насочва д-р Химчева да изучи в детайли нейните същност, зависимост от физиологични фактори, неврохимизъм, медиация и модулация чрез опиоидите и конкретно да изследва ролята на комплекса ноцицептин/орфанин-ноцицептинов рецептор(N/OFQ/NOP) на експериментален модел на плъх. Стресът в краткосрочен аспект осигурява защита на организма чрез повишени резистентност и адаптация. При реализиране на еволюционно съхранения защитен механизъм "бори се или бягай", временното потискане на болката е възможност за оцеляване. Но продължителното действие на стресорите може да доведе до дезадаптация, невропептиден дисбаланс, повишена болкова чувствителност и емоционална нестабилност. По време на стрес се развива и стрес-индуцирана аналгезия. Реакцията се опосредства от множество невромодулаторни системи, сред които ендогенната опиоидна система играе ключова роля.

Защо д-р Ивелина Химчева фокусира научния си интерес към ендогенния невропептид ноцицептин/орфанин и неговия ноцицептинов рецептор(NOP). Въпрос, наложен от:

- участието му в медиацията на стрес индуцираната аналгезия;

- антиопиоидния профил на неuropeптида, структурно наподобяващ класическите опиоидни пептиди, но невзаимодействащ с δ -, κ - и μ - рецептори;

- избирателното активиране на NOP – G- протеин свързан рецептор с уникален физиологичен профил, водещо до потискане на освобождаването на медиатори и модулиране на ендокринната, болковата, поведенческата и емоционалната реактивност към стрес;

- проявата на антиноцицептивни ефекти при остър стрес и на повишена рецепторна и болкова чувствителност при хроничен стрес;

- възможността за изучаване ефектите на нови синтетични аналози на ноцицептин/орфанин при експериментални модели на остър и хроничен стрес.

Въз основа на горепосоченото, **темата** на представения дисертационен труд, посветена на изучаване ефектите на нови аналози на ноцицептина върху болковата перцепция при остър и хроничен имобилизационен стрес е съвременна, актуална и логично продължение на богатия **литературен обзор**, представен в критичен стил, включващ над 570 източника, от които нито един на български и с доминация на тези от последните 5 години - факт потвърждаващ пионерния за България характер на научното изследване. Целенасочено, д-р Химчева, на базата на литературни данни, очертава генетичния, структурен и молекулен произход на ноцицептина, функционалния му профил и физиологичната му роля при повлияване на болката, реализиращите остър и хроничен стрес системи, моделите на стрес-индуцирана аналгезия, както и

възможностите за медиацията и модулацията ѝ. Проследявайки литературните данни, съществен акцент докторантът поставя върху съвременната концепция за болката – класификацията ѝ въз основа на критерии като етиология, продължителност, локализация и неврофизиологични механизми на повлияването ѝ. Чрез болката - еволюционно обусловен защитен механизъм, организмът реагира на реално или потенциално увредени тъкани. Възприятието за болка е пряко свързано с физиологичното поведение на ноцицепторите – свободни нервни окончания, активирани от физични фактори, ендогенни физиологично активни вещества и екзогенни агенти с надпрагова стойност. Провеждането на информацията към централната нервна система (ЦНС) се осъществява по три основни типа аферентни нервни влакна, отличаващи се по диаметъра си, наличието или отсъствието на миелинова обвивка и скоростта на провеждане.

Д-р Химчева акцентира вниманието си и върху натрупаните в литературата доказателства за ролята на глията - при физиологични условия астроцитите и микроглията имат ограничено участие за възприемането на болката, но при увреждане на периферните неврони се регистрира повишена възбудимост, развитие на невропатна болка и централна сенситация. Микроглията секретира проалгогенни фактори, предизвикващи разширяване на рецептивните полета и поддържане на болковата чувствителност, а астроцитите участват в дългосрочното усиление на сигналите през химичните синапси. Възприятието за болка е резултат от соматосензорни, афективно-мотивационни и когнитивни компоненти, свързани с ядрата на мозъчния ствол, таламуса, диенцефалона и зони в кортекса. Активират се невромодулаторни системи, допринасящи за аналгезията както при физиологични, така и при патофизиологични състояния. При физиологични условия ЦНС осигурява динамичното равновесие между усиляването и

потискането на болковите сигнали, като чрез низходящия контрол предпазва организма от прекомерна чувствителност към увреждащи стимули. При патологични състояния настъпват невропластични промени, последвани от усилване на болковите сигнали с прояви на хипералгезия. В този контекст N/OFQ/NOP рецепторна система може да играе ролята на потенциален медиатор на десцендентното усилване на болката на базата на антиопиоиден ефект. Нарасналата експресия на NOP рецепторите предполага хронифициране и повишаване на емоционалното преживяване на болката.

Целта на научното изследване е формулирана ясно и е подчинена на хипотезата нови аналози на ноцицептина да реализират аналгетични ефекти върху болковата перцепция, както и да взаимодействат с опиоидната, ноцицептивната и азотокисната системи при експериментални модел на остър и хроничен имобилизационен стрес.

Задачите, 5 на брой, обосновават мотивацията за реализиране на дисертационния труд, Чрез тестове, регистриращи активирането на механо- и терморелептори както при интактни, така и при подложени на остър и хроничен имобилизационен стрес плъхове, д-р Химчева се стреми да изследва не само аналгетичните ефекти на два нови аналога на ноцицептина, но и възможността те да се повлияват от неселективния опиоиден рецепторен антагонист налоксон и азотноокисната система. Петата задача, проследяваща ефектите на ноцицептина и аналози върху серумните нива на АСТН, кортизол и адреналин при остър и хроничен имобилизационен стрес не е пряко свързана с поставената цел, но допринася за обогатяване на научната идея.

Дизайнът, материалът и методите на представения дисертационен труд дават обективна възможност за

осъществяване на поставените цел и задачи. Експериментите са проведени върху 400 мъжки полово зрели плъхове, порода Wistar (180-200g), отглеждани в полипропиленови клетки със свободен достъп до вода и храна в условия на температурен комфорт с регулиран цикъл на светлина. Научното изследване е извършено в съответствие с националните и международни изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и е одобрено от Българската агенция по безопасност на храните. Приложените методи – *in vivo* (ноцицептивни, за предизвикване на остър и хроничен имобилизационен стрес) и имунологични, както и синтез на аналози на ноцицептин обективизират реализирането на научното изследване и гарантират получаването на данни с висока степен на доказателственост. За всеки от приложените методи са представени експериментални протоколи. Статистическата обработка и анализ на събраните данни са извършени със специализиран статистически софтуер SPSS, версия 26.0, като количествените променливи са описани чрез изчисляване на средна аритметична стойност и стандартна грешка за характеризиране на централната тенденция и вариабилност на данните. За проверка на хипотезата за наличие на различия е приложен еднофакторен дисперсионен анализ. При установяване на статистически значими различия е използван *post hoc* тест на Bonferroni за множествени сравнения между експерименталните групи. За онагледяване на различията между изследваните групи са използвани стълбовидни диаграми, представящи средни стойности, доверителни интервали и ниво на статистическа значимост.

Представените **собствени резултати** от извършените тестове на животните от различните експериментални групи и съответното им по глави **обсъждане** са изложени и дискутирани подходящо и илюстрирани с 32 фигури. Аналгетичните ефекти на новосинтезираните два аналога на

ноцицептина, изследвани чрез тестове, въвличащи механо- и терморекцепторите в доза 10µg/kg при подложените на остър и хроничен имобилизационен стрес животни показват статистически значимо повишаване на болковия праг. Д-р Химчева изказва хипотезата, че двойната орнотинова модификация може да усили връзката с NOP рецептора и да подобри стабилността на пептида. При изследване влиянието на NOP-селективния антагонист JTC-801, приложен в доза 0.5 mg/kg д-р Химчева установява, че хроничният имобилизационен стрес води до статистическо значимо повишаване на болковия праг на 10тата и 20тата минута, като предизвиква хиполгезия и удължава латентното време. Така получените резултати показват високата селективност на JTC-801 към NOP рецептора като аналгетичният ефект е най-силен в началните минути след приложението и доказват, че NOP рецепторната модулация може да варира в зависимост от вида и продължителността на стреса и физиологичното състояние на животните. Докторантът прави оценка на функционалната активност на ендогенната опиоидна система чрез приложението на неселективния опиоиден рецепторен антагонист налоксон установява, че самостоятелното му приложение статистически значимо понижава болковия праг, т.е. установява се налоксон индуцирана хипералгезия и скъсява латентното време. Приложен обаче заедно с двата новосинтезирани аналога на ноцицептина, налоксонът на 10тата минута статистически достоверно повишава болковия праг и удължава латентното време. Д-р Химчева изказва хипотезата, че аналгезията, индуцирана от ноцицептин/орфанин може да бъде чувствителна към налоксон при периферно или интратекално приложение – факт, допълнително подчертаващ сложността на взаимодействие между NOP рецептора и опиоидната система. Структурно модифицираните аналози на ноцицептина са с подобрена рецепторна селективност към NOP рецептора и устойчивост на ензимна деградация – възможност да се обясни по-

слабо изразения антагонизъм с налоксона в началото на тестовете. При изследване влиянието на азотоксидната система върху аналгетичните ефекти на ноцицептина и двата му новосинтезирани аналога, д-р Химчева установява че приложението на L-arg (прекурсор на азотния оксид) сигнификантно повишаване на болковия праг и удължаване на латентното време, потвърждавайки аналгетичния му ефект. Приложението на инхибитора на NOS – L-NAME осъществява статистически значимо понижаване на болковия праг и скъсяване на латентното време – данни потвърждаващи хипералгетичния му ефект. Така докторантът потвърждава ролята на NO в поддържането на аналгезията в условията на остър стрес. При хроничен стрес свръхпродукцията на NO в съчетание с повишената експресия на iNOS може да промени ефектите от активирания NOP рецептор и да предизвика хипералгезия.

В отговор на поставените цел и задачи и в непосредствена връзка с представените резултати, д-р Химчева оформя и формулира коректно и ясно 13 извода. Те са групирани в съответствие с изследваните ефекти на новосинтезираните аналози на ноцицептина, на неселективния опиоиден рецепторен антагонист налоксон и на азотоксидната система върху болковата перцепция както при остър, така и при хроничен имобилизационен стрес. Наблюдаваните и изследвани ефекти на ноцицептина и ново синтезираните му два аналога подкрепят хипотезата за двупосочния ефект на ноцицептивната система – от една страна да усилва реакцията при остър стрес, но от друга – да ограничи активацията на НРА ос при хронични или патологични стресови състояния.

Изведените оригинални приноси са с научно–теоретичен и приложен характер. Достоинствата на представения дисертационен труд са свързани не само със сравняването на

аналгетичните ефекти на новосинтезираните аналози на ноцицептина, съединения с повишена биостабилност и рецепторна избирателност, при интактни животни, но и с изследването на физиологичните им ефекти върху болковата перцепция, изведени на базата на експериментални модели на остър и хроничен имобилизационен стрес върху 400 мъжки плъхове порода Wistar. Регулацията на болковата перцепция е предизвикателство както в невробиологичен, така и в клиничен аспект и чрез представеното научно изследване д-р Химчева предлага перспективен фармакологичен подход за по-прецизна модулация на болката при стрес-асоциирани болкови състояния.

Изготвеният от д-р Ивелина Химчева **авторереферат** е в обем от 69 стандартни страници, онагледен с 30 фигури, и отразява основните раздели на дисертационния труд.

Собствените резултати, отразяващи реализираното научно изследване, д-р Химчева представя чрез **научни публикации:** 3 в реферирани и индексирани в световноизвестни база данни списания, една от които с импакт-фактор и в 2 от които е водещ автор, и 5 в нереферирани, в 3 от които е водещ автор. Д-р Химчева има 19 участия в научни форуми с публикувано резюме в сборник/списание – в 12 от които е първи автор.

Докторантът има 3 участия в научно-изследователски проекти – в два вътреуниверситетски проекта, финансирани от МУ-Плевен, и в един, финансиран от МУ-София.

В ЗАКЛЮЧЕНИЕ, представеният от д-р Химчева дисертационен труд е структуриран съобразно изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Регламента за придобиване на Образователната и Научна степен (ОНС) ДОКТОР на МУ – Плевен, напълно завършен,

методологично издържан и е с научно-клинично приложен характер. Съвкупността от дискутабилни проблеми, коректните методи на научното изследване и възможността чрез изследване ефектите на новосинтезирани аналози на ноцицептина върху болковата перцепция при остър и хроничен имобилизационен стрес да се реализират нови стратегии в неврофармакологията, както и авторската справка за съответствие на научните публикации с минималните национални изисквания, ми дават основание да дам положителна оценка на дисертационния труд на тема: **“ЕФЕКТИ НА НОВИ АНАЛОЗИ НА НОЦИЦЕПТИНА ВЪРХУ БОЛКОВАТА ПЕРЦЕПЦИЯ ПРИ ОСТЪР И ХРОНИЧЕН ИМОБИЛИЗАЦИОНЕН СТРЕС”** и да препоръчам на уважаемото Научно жури да гласува положително за присъждане на Образователната и Научна Степен „ДОКТОР” на д-р **ИВЕЛИНА ИВАНОВА ХИМЧЕВА** в професионално направление 7.1. Медицина, докторска програма ”Физиология на човека” към Медицински Университет – Плевен.

На основание чл.59 от ЗЗЛД

20.01.2026 г.

Изготвила становището:.....

(проф. д-р Юлия Георгиева Николова, ДМ)

TO

VICE-RECTOR of Scientific Affairs,

MEDICAL UNIVERSITY - Pleven

S T A T E M E N T

by

prof. JULIA GEORGIEVA NIKOLOVA, DM, PhD –

Department of physiology of the Faculty of Medicine,
Medical University - Plovdiv

regarding

D I S S E R T A T I O N

for awarding the educational and scientific degree "DOCTOR" in the professional field 7.1. Medicine, doctoral program "Physiology of man" on the topic:

"EFFECTS OF NEW ANALOGUES OF NOCICEPTIN ON PAIN PERCEPTION IN SEVERE AND CHRONIC IMMOBILIZATION STRESS".

Doctoral student: ***IVELINA IVANOVA HIMCHEVA, MD***

Scientific supervisors: ***prof. ADRIANA BOCHEVA, DM, PhD (†)***

***prof. GALYA STAVREVA- MARINOVA,
DM, PhD, Medical University- Pleven***

Stress is a state of a complex of physiological and psychological changes aimed at restoring disturbed homeostasis. In the 1930s, Hans Selye defined stress as a General Adaptation Syndrome, realizing a physiological response to a threat in three phases: an alarm reaction, a stage of resistance and a stage of exhaustion. Regardless of the nature of the stressors and the duration of their action - acute or chronic, the body reacts through physiological and behavioral changes that ensure its adaptation: increased excitability, attention, cognitive activity and alertness, activation of the cardiovascular and respiratory systems, redistribution of blood flow to the brain or striated muscles depending on whether the stress is neuropsychic or physical, increased cellular metabolism and increased body temperature, modulation of the immune response, reduction of appetite and sexual functions. The adaptation of the body to mobilize itself during severe stress is carried out through an integrated regulation, built on the basis of the functional interaction between the nervous, endocrine and immune systems. The neurophysiological response is realized through the activation of the sympathoadrenal system and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. In chronic stress, however, the physiological cost of adaptation is associated with persistent sympathetic hyperactivity, chronic secretion of glucocorticoids, overactivation of the renin-angiotensin-aldosterone system, immunosuppression and behavioral manifestations of depression and anxiety.

Ivelina Himcheva, MD has focused her scientific research on pain perception during acute and chronic stress due to:

- the modulating short-term and long-term involvement of neuropeptides in the so-called stress-induced analgesia, and specifically the role of opioids - enkephalins, endorphins, dynorphins and especially nociceptin/orphanin (N/OFQ);
- the independent and functionally distinct nociceptin/orphanin-nociceptin receptor complex (N/OFQ/NOP) through its involvement in the control of chronic pain and anxiety;
- the key role of the mesolimbic and mesocortical dopaminergic systems in motivational processes, reward and emotional assessment of stress in the course of adaptive behavior.

The modern neurobiological understanding of stress-induced analgesia directs Himcheva, MD to study in details its nature, dependence on physiological factors, neurochemistry, mediation and modulation by opioids and specifically to investigate the role of the nociceptin/orphanin-nociceptin receptor (N/OFQ/NOP) complex in an experimental rat model. Severe stress provides protection for the body through increased resistance and adaptation. When implementing the evolutionarily preserved protective mechanism "fight or flight", temporary pain suppression is an opportunity for survival. However, the prolonged action of stressors can lead to maladaptation, neuropeptide imbalance, increased pain sensitivity and emotional instability. Stress-induced analgesia also develops during stress. The reaction is mediated by multiple neuromodulatory systems, among which the endogenous opioid system plays a key role.

Why did Ivelina Himcheva, MD focus her scientific interest on the endogenous neuropeptide nociceptin/orphanin and its nociceptin receptor (NOP). A question posed by:

- its involvement in the mediation of stress-induced analgesia;
- the antiopioid profile of the neuropeptide, structurally resembling classical opioid peptides, but not interacting with δ -, κ - and μ - receptors;
- the selective activation of NOP – a G-protein coupled receptor with a unique physiological profile, leading to suppression of mediator release and modulation of endocrine, pain, behavioral and emotional reactivity to stress;
- the manifestation of antinociceptive effects in acute stress and of increased receptor and pain sensitivity in chronic stress;
- the possibility of studying the effects of new synthetic analogues of nociceptin/orphanin in experimental models of severe and chronic stress.

Based on the above, the **topic** of the presented dissertation work, dedicated to studying the effects of new nociceptin analogues on pain perception in severe and chronic immobilization stress, is a contemporary, relevant and logical continuation of the rich **literature review**, presented in a critical style, including over 570 sources, none of which are in Bulgarian and with a

predominance of those from the last 5 years - a fact confirming the pioneering nature of the scientific research for Bulgaria. Purposefully, Himcheva,MD based on the literature review data, outlines the genetic, structural and molecular origin of nociceptin, its functional profile and its physiological role in influencing pain, the systems realizing severe and chronic stress, the models of stress-induced analgesia, as well as the possibilities for its mediation and modulation. Following the literature review data, the doctoral student places significant emphasis on the modern concept of pain - its classification based on criteria such as etiology, duration, localization and neurophysiological mechanisms of its influence. Through pain - an evolutionarily determined protective mechanism, the organism reacts to actually or potentially damaged tissues. The perception of pain is directly related to the physiological behavior of nociceptors - free nerve endings activated by physical factors, endogenously physiologically active substances and exogenous agents of a suprathreshold value. The conduction of information to the central nervous system (CNS) is carried out by three main types of afferent nerve fibers, distinguished by their diameter, the presence or absence of a myelin sheath and the velocity of conduction.

Himcheva,MD also focuses on the literature review accumulated evidence for the role of glia - under physiological conditions, astrocytes and microglia have a limited participation in the perception of pain, but when peripheral neurons are damaged, increased excitability, development of neuropathic pain and central sensitization are registered. Microglia secretes proalgogenic factors that cause expansion of receptive fields and maintenance of pain sensitivity, while astrocytes participate in the long-term amplification of signals through chemical synapses. The perception of pain is a result of somatosensory, affective-motivational and cognitive components associated with the nuclei in the brainstem, thalamus, diencephalon as well as areas in the cortex. Neuromodulatory systems contributing to analgesia in both physiological and pathophysiological conditions are activated. Under physiological conditions, CNS ensures the dynamic balance between the amplification and suppression of pain signals, and through descending control protects the body from excessive sensitivity to damaging stimuli. In pathological conditions, neuroplastic changes occur, followed by amplification of pain signals with manifestations of hyperalgesia. In this context, the N/OFQ/NOP receptor system may play the role of a potential transmitter of the descending amplification

of pain based on the antiopioid effect. The increased expression of NOP receptors suggests a chronicity and an increase in the emotional experience of pain too.

The **goal** of the scientific research is clearly formulated and is subject to the hypothesis that new nociceptin analogues will realize analgesic effects on pain perception, as well as interact with the opioid, nociceptive and nitric oxide systems in experimental models of severe and chronic immobilization stress.

The **tasks**, 5 in number, justify the motivation for the realization of the dissertation work. Through tests registering the activation of mechano- and thermoreceptors in both intact rats and such subjected to severe and chronic immobilization stress, Himcheva,MD seeks to investigate not only the analgesic effects of the two new nociceptin analogues, but also the possibility that they may be influenced by the non-selective opioid receptor antagonist naloxone and the nitric oxide system. The fifth task, monitoring the effects of nociceptin and analogues on serum levels of ACTH, cortisol and adrenaline in acute and chronic immobilization stress, is not directly related to the set goal, but contributes to the enrichment of the scientific idea.

The **design, material and methods** of the presented dissertation work provide an objective opportunity to achieve the set goals and tasks. The experiments are conducted on 400 male sexually mature rats, Wistar breed (180-200g), raised in polypropylene cages with free access to water and food in conditions of temperature comfort with a regulated light/dark cycle. The scientific research is carried out in accordance with national and international requirements for the protection and humane treatment of experimental animals and is approved by the Bulgarian Food Safety Agency. The applied methods - in vivo (nociceptive, for inducing acute and chronic immobilization stress) and immunological, as well as synthesis of nociceptin analogues objectify the implementation of the scientific research and guarantee the receipt of data with a high degree of evidence. Experimental protocols are presented for each of the applied methods. The statistical processing and analysis of the collected data are performed with specialized statistical software SPSS, version 26.0, and the quantitative variables are described by calculating the arithmetic mean and standard error to characterize the central tendency and variability of the data. To test the hypothesis of the

presence of differences, a one-way analysis of variance is applied. When statistically significant differences are established, a post hoc Bonferroni test is used for multiple comparisons between the experimental groups. To illustrate the differences between the studied groups, bar charts are used, representing mean values, confidence intervals and level of statistical significance.

The presented own **results** from the tests performed on animals from the different experimental groups and their discussion are presented and discussed appropriately and illustrated with 32 figures. The analgesic effects of the newly synthesized two nociceptin analogues, studied through tests involving mechano- and thermoreceptors at a dose of 10µg/kg in animals subjected to acute and chronic immobilization stress, show a statistically significant increase in the pain threshold. Dr. Himcheva hypothesized that the double ornithine modification can enhance the connection with the NOP receptor and improve the stability of the peptide. When studying the influence of the NOP-selective antagonist JTC-801, administered at a dose of 0.5 mg/kg, Himcheva,MD found that chronic immobilization stress leads to a statistically significant increase in the pain threshold at the 10th and 20th minutes, causing hypoalgesia and prolonging the latency time. The results thus obtained show the high selectivity of JTC-801 towards the NOP receptor, with the analgesic effect being strongest in the initial minutes after administration and proving that NOP receptor modulation can vary depending on the type and duration of stress and the physiological state of the animals. The doctoral student assesses the functional activity of the endogenous opioid system by administering the non-selective opioid receptor antagonist naloxone and finds that its administration alone statistically significantly lowers the pain threshold, i.e. naloxone-induced hyperalgesia is established and the latency time is shortened. However, when administered together with the two newly synthesized nociceptin analogues, naloxone statistically significantly increases the pain threshold and prolongs the latency time at the 10th minute. Dr. Himcheva hypothesizes that the analgesia induced by nociceptin/orphanin may be sensitive to naloxone when administered peripherally or intrathecally – a fact that further emphasizes the complexity of the interaction between the NOP receptor and the opioid system. Structurally modified nociceptin analogs have improved

receptor selectivity for the NOP receptor and resistance to enzymatic degradation – a possibility to explain the less pronounced antagonism with naloxone at the beginning of the tests. When studying the influence of the nitric oxide system on the analgesic effects of nociceptin and its two newly synthesized analogs, Dr. Himcheva found that the administration of L-arg (a precursor of nitric oxide) significantly increased the pain threshold and prolonged the latency time, confirming its analgesic effect. The administration of the NOS inhibitor – L-NAME achieved a statistically significant decrease in the pain threshold and shortened the latency time – data confirming its hyperalgesic effect. Thus, the doctoral student confirms the role of NO in maintaining analgesia in conditions of acute stress. In chronic stress, the overproduction of NO in combination with the increased expression of iNOS can change the effects of the activated NOP receptor and cause hyperalgesia.

In response to the set goals and tasks and in direct connection with the presented results, Himcheva, MD correctly and clearly formulates 13 **conclusions**. They are grouped in accordance with the studied effects of the newly synthesized analogues of nociceptin, the non-selective opioid receptor antagonist naloxone and the nitric oxide system on pain perception in both severe and chronic immobilization stress.

The **contributions** made are of a scientific-theoretical and applied nature. The merits of the presented dissertation work are related not only to the study of the physiological effects of newly developed synthetic analogues of nociceptin - compounds with increased biostability and receptor selectivity, on pain perception, derived on the basis of experimental models of acute and chronic immobilization stress on 400 male Wistar rats. The regulation of pain perception is a challenge both in neurobiological and clinical aspects. Himcheva, MD offers a promising pharmacological approach for more precise modulation of pain in stress-associated pain conditions.

The **abstract** prepared by Ivelina Himcheva, MD is 69 standard pages long and supported by 30 figures and reflects the main sections of the dissertation.

Himcheva, DM presents her own results, reflecting the implemented scientific research, through **scientific publications**: 3 in refereed and indexed in world-renowned databases of journals, in 2 of them she is the first author, and 5 in non-refereed, in 3 of them she is the first author. Himcheva, MD has 19 participations in scientific forums with a published abstract – in 12 of them she is the first author.

The doctoral student has 3 participations in scientific research projects – in two intra-university projects funded by MU-Pleven, and in one funded by MU-Sofia.

In **CONCLUSION**, the dissertation presented by Himcheva, DM is structured in accordance with the requirements of the Act on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulation for the Acquisition of the Educational and Scientific Degree (ESD) DOCTOR of MU – Pleven, is entirely completed, methodologically sound and is of a scientifically and clinically applied nature. As the set of debatable problems, the correct methods of scientific research and the possibility through research the effects of newly synthesized nociceptin analogs on pain perception in severe and chronic immobilization stress to implement new strategies in neuropharmacology as the author's checking for scientific publications corresponding to the minimal national requirments give me reason to give a positive assessment of the dissertation work on the topic: "EFFECTS OF NEW NOCICEPTIN ANALOGS ON PAIN PERCEPTION IN SEVERE AND CHRONIC IMMOBILIZATION STRESS" and to recommend to the esteemed Scientific Jury to vote positively for awarding the Educational and Scientific Degree "DOCTOR" to IVELINA IVANOVA HIMCHEVA, DM in professional field 7.1. Medicine, doctoral program "Physiology of man" at the Medical University – Pleven.

На основание чл.59 от ЗЗЛД

01/20/2026

Prepared the statement:.....

(Prof. Julia Georgieva Nikolova, DM, PhD)