

АВТОРСКА СПРАВКА ЗА НАУЧНИ ПРИНОСИ

1. *Публикации извън дисертационния труд*: **55** научни и **2** обзорни статии.
 2. *Публикации предоставени за конкурса*: **35** статии в научни списания, **6** статии в сборници и **2** обзорни статии - общо **43** статии. От тях **32** са публикувани в реферирани и/или международни издания;
 3. *Импакт фактор*: Общ **43.591** / Индивидуален: **10.723** (*от статии*: **11.543** / **2.379**; *от резюмета*: **32.048** / **8.344**);
 4. *Общ брой цитирания*: **55**;
 5. *Участия в научни конгреси, симпозиуми, конференции, семинари*: над **90** постери и/или доклади в **60** научни мероприятия;
 6. *Участия в научни проекти*: **15** (ръководител на **2** от тях).
-

ПРИНОСИ С ФУНДАМЕНТАЛНО ЗНАЧЕНИЕ

Концепцията за това, че опиоидните пептиди са аналгетични субстанции, регулиращи реакцията на болка е общоприета. Болката е не само физиологичен и патофизиологичен процес, но тя е и психично явление с широк спектър от индивидуални нюанси. Едно от най-добрите достижения е разкриване на функционалната роля на опиоидната система в контрола на ноцицепцията. Известно е, че всички ендогенни опиоидни пептиди повлияват директно или индиректно невротрансмитерните процеси. Преобладаващ е инхибиторния ефект, проявяващ се най-често като пресинапсно подтискане на секрецията на невротрансмитери.

Днес е известно, че стресът също предизвиква отделяне на опиоидни пептиди, водещи до антиноцицептивни ефекти. Този важен феномен е свързан с болковата перцепция и е наречен стрес-индуцирана аналгезия. Следователно, ендогенната опиоидна система е важен модулатор на жизненоважни адаптационни функции в човешкия и животински организъм. Ендогенните опиоиди упражняват физиологични и фармакологични ефекти, взаимодействайки с опиоидните μ -, δ -, κ - и NOP-рецептори. Широкото разпространение на опиоидергичните неврони и на опиоидните рецептори в централната и периферната нервна система обуславя участието на опиоидната система в регулацията на широк диапазон адаптационни реакции. Тя участва в контрола на респираторната, кардиоваскуларната, хормоналната секреция на хипофизата, моторната активност на стомашно-чревния тракт, в етиологията на редица патологични състояния, такива като епилепсия, психози, депресии, Паркинсонизъм, стрес.

В хода на нашите изследвания бяха проучени ноцицептивните ефекти и

невромодулаторните въздействия на опиоидни пептиди и неuropeптиди (киоторфин и аналози, пептиди от семейството на Туг-MIF-1 и аналози, енкефалини и аналози, ноцицептин и аналози) върху опиоид-, хистамин-, азотноокисната- и адренергичната невромедиаторни системи, както в норма, така и при различни стресови и патологични състояния в ЦНС и периферната нервна система.

Интересът към пептидите – невромодулатори в ЦНС е продиктуван от изясняване участието им в някои патологични процеси (напр. стрес-индуцирани заболявания). Опиоидните пептиди оказват влияние върху контрола на двигателната активност и играят важна роля при стресови ситуации и редица психични заболявания. Установяването на връзка между структурата на пептидите и тяхното биологично действие води до целенасочено търсене на пептиди повлияващи определени функции в организма, а от там и до целенасочено синтезиране на нови съединения с желан противоболков ефект, които имат химична структура различна от тази на изолираните от природните източници пептиди, но притежават способност да взаимодействат със специфични рецептори.

Резултатите от изследванията могат да имат фундаментално значение за разбиране на някои страни на пептидергичната регулация/модулация в протичането на някои стрес-индуцирани патологични процеси, невроефекторни взаимоотношения, психични реакции.

I. Проучени са опиоидните пептиди киоторфин, пептиди от семейството на Туг-MIF-1, ноцицептин, енкефалин и техни аналози

Известно е, че голям брой опиоидни пептиди съдържат в молекулата си дипептида киоторфин (Туг-Arg, Куо). Той е ендегенен неuropeптид играещ роля в регулацията на болката и е ендегенен Мет-енкефалин-рилизинг дипептид в централна и периферна нервна система. Аналгетичният му ефект се антагонизира от Leu-Arg (специфичен киоторфинов антагонист). Прекурсорът на Куо - L-Arginine (L-Arg) има лимитираща роля в аналгетичния му ефект при централно въвеждане в мишки и плъхове. Клинични резултати демонстрират налоксон-обратим ефект при въвеждане на L-Arg у пациенти с различни видове хронична болка подсказващи за потенциалните възможности за терапевтично приложение на тази аминокиселина. Всички данни относно локализацията и ефектите на Куо подчертават важната му роля в болковата перцепция. Проучването на механизмите заложен в ефектите на нови структурно близки дипептиди е предпоставка за търсенето на нови фармакологични средства в борбата с болката.

Семейството на Туг-MIF-1 се състои от четири ендегенни неuropeптида: MIF-1, Туг-MIF-1, Туг-W-MIF-1 и Туг-K-MIF-1. Открити са в ЦНС и тяхното разпределение и специфични места за свързване съвпадат с разпределението на опиоидните рецептори. Пептидите се намират в области отговорни за контрола на ноцицептивното предаване (спинални или супраспинални), в контрола на емоциите, храненето, терморегулацията. Те оказват влияние върху активността на неврони носители на опиоидни рецептори и по този начин участват в своеобразна хомеостатична система регулираща ефектите им. Освен опиоидни, Туг-MIF-1 пептидите притежават и антиопиоидни свойства.

Ноцицептинът, известен още и като орфанин FQ (N/OFQ), е неuropeптид, структурно

подобен на опиоидните пептиди, който не взаимодейства с класическите опиоидни рецептори. N-крайният фрагмент Phe-Gly-Gly-Phe е подобен на N-крайния “квартет” Tyr-Gly-Gly-Phe на диноρφините, ендорфините и енкефалините. Основната разлика от другите опиоидни пептиди е замяната на Tyr¹ с Phe¹. Хептадекапептидът N/OFG (Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln) селективно активира свой собствен рецептор NOP, наречен още ORL₁ или OP₄, който е нов член на групата на опиоидните рецептори. Специфичното разположение на NOP-рецептора и ноцицептина в мозъка показва, че те участват в модулирането на множество процеси, контролирани от централната нервна система. Ноцицептинът оказва влияние върху усещанията за болка, страх, върху апетита, двигателната активност, обучението и паметта. В периферната нервна система ноцицептинът повлиява функциите на сърдечно-съдовата, храносмилателната, отделителната и дихателната системи.

1. Изучени са ноцицептивните ефекти на опиоидни пептиди, техни аналози и някои невромедиаторни системи и вторични посредници

A. Опиоидергична невромедиаторна система

A.1. Киоторфин, ноцицептин и пептиди от семейството на Tyr-MIF-1 - В изследвания *in vivo* бе установено, че Куо, ноцицептинът и пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 при остра болка имат изразени аналгетични ефекти, които са налоксон (Nal)-обратими (*статия № 2, 7, 17, 25, 31, 40*).

MIF-1 антагонизира противоболковите ефекти на аминокиселините L-Canavanine, L-Ornithine, L-Citruline, L-Canaline (*статия № 6*).

A.2. Киоторфинови дипептидни и Tyr-MIF-1 аналози - В изследвания *in vivo* бе установено, че новосинтезирани Куо дипептидни и Tyr-MIF-1 аналози - Tyr-Cav, Tyr(Cl₂)-Cav, Leu-sArg, и Tyr-sArg имат изразени противоболкови ефекти при остра болка, които се реверсират от неселективният инхибитор на опиоидните рецептори налоксон (*статия № 2, 40*).

A.3. Киоторфинови норсулфоаргининови аналози - Бяха изучени ноцицептивните ефекти на четири новосинтезирани киоторфинови аналози, съдържащи норсулфоаргинин - TK1 (NsArg-Tyr), TK2 (Tyr-NsArg), TK3 (Tyr-NsArg-NH₂) and TK4 (Tyr-NsArg-Bzl). Получените резултати показаха, че TK4 и TK2 повишиха статистически достоверно болковия праг и удължиха НР-латентния период в сравнение с Куо (*статия № 12*).

A.4. MIF-1 и Tyr-MIF-1 аналози съдържащи непротеинови аминокиселини и синапена киселина - Аналгетичната активност на новосинтезирани MIF-1 и Tyr-MIF-1 аналози, съдържащи непротеинови аминокиселини – канаванин (Cav) и лизин (sLys), и синапена киселина (SA), принадлежаща към групата на канелените киселини, бе проучена върху мъжки плъхове порода Wistar чрез два теста - raw pressure и hot plate. За изясняване участието на опиоидергичната система в аналгетичните им ефекти бе въвеждан налоксон. Получените резултати показаха, че новосинтезираните MIF-1 аналози повишават болковия праг, докато Tyr-MIF-1 аналозите го намаляват. Налоксонът потиска аналгетичните ефекти на изследваните пептиди (*статия № 13*).

А.5. Tyr-MIF-1 аналози с инкорпорирани аминокиселини - Изучени бяха ноцицептивните ефекти на новосинтезирани Tyr-MIF-1 аналози: Tyr-Orn-MIF-1, Tyr-Cit-MIF-1, Tyr-Cav-MIF-1, Tyr-Can-MIF-1. Получените резултати показаха, че само инкорпорирането на L-canavanine и L-citruline в молекулата на Tyr-MIF-1 повишава болковия праг и НР-латентността на нативния пептид. Опиоидният характер на новосинтезираните Tyr-Cit-MIF-1 и Tyr-Cav-MIF-1 бе доказан и от факата, че след претретиране с налоксон аналгетичните им ефекти бяха понижени (*статия № 20*).

А.6. Новосинтезирани N-модифицирани с α -аминофосфонови киселини аналози на N/O/FQ(1-13)NH₂ - От шестте проучени ноцицептинови аналози само аналозите с най-голям циклоалканов пръстен (7-8 въглеродни атома – аналози 3, 5 и 6) показаха аналгетични ефекти спрямо контролата. Тези ефекти обаче, бяха значително по-слаби от аналгетичния ефект на ноцицептин (1-13). Опиоидергичната невротрансмитерна система е въввлечена в аналгетичните ефекти на аналози 3, 5 и 6, тъй като въвеждането на неспецифичният инхибитор на опиоидните рецептори налоксон подтиска ефектите им до хипералгезия. Блокирането на ноцицептиновите рецептори със селективния антагонист JTC-801 инхибира аналгетичните ефекти на аналози 3, 5 и 6, което подсказва, че те са медириани и от ноцицептиновата невромедиация. Изследваните новосинтезирани аналози 3, 5 и 6 подтиснаха мощният противоболков ефект на L-NAME, което предполага, че тези аналози най-вероятно освен опиоидни притежават и антиопиоидни ефекти. Аналозите 3, 5 и 6 подтиснаха и аналгетичният ефект на прекурсора на азотния оксид L-arginine, което показва участието на азотноокисната система в техните ефекти (*статия № 25, 31*).

А.7. Новосинтезирани N-модифицирани с α -аминофосфонови киселини Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ аналози – Хексапептидът Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ (2) е селективен агонист за ноцицептиновия рецептор. От проучените четири хексапептидни аналога, всички (3, 4 и 6) показаха аналгетични ефекти спрямо контролата, с изключение на пептида съдържащ циклооктанов пръстен в молекулата си (5). Претретирането с налоксон подтисна противоболковите ефекти на 2, 3, 4 и 6 до хипералгезия, което показва участието на опиоидергичната невротрансмитерна система. Антагонистът на NOP-рецептора JTC-801 инхибира аналгетичните ефекти на хексапептиди 2, 3, 4 и 6, т.е. в противоболковите им ефекти освен опиоидната участва и ноцицептиновата невромедиация (*статия № 32*).

Б. Хистаминергична невромедиаторна система - Хистаминът (НА) се приема като невротрансмитер или невромодулятор в ЦНС и се свързва със специфични хистаминови рецептори разположени върху или в клетъчната мембрана. НА е най-мощният агонист на Н₁-рецепторите, стимулиращ ноцицепторите и предизвикващ хипералгезична реакция, чийто механизъм не е съвсем ясен, но по всяка вероятност е свързан с повишаването на Ca²⁺ пермеабилитет, отделянето на тахикинини и др.

Хистаминергичната система е въввлечена в аналгетичната активност на Куо, Tyr-MIF-1 и техните новосинтезирани аналози Tyr-Cav, Tyr(Cl₂)-Cav, Leu-sArg и Tyr-sArg. Антиноцицептивните ефекти на изследваните дипептиди се потенцират от Н₁-

антагониста diphenhydramine (DPH, 100 мкг/кг), H₂-антагониста cimetidine (CIM, 50 мг/кг) и H₂-агониста Dimaprit (DMP, 5 мг/кг) (статия № 2, 40).

В. Азотноокисна невромедиаторна система - Известно е, че азотният оксид (NO) синтезиран в невроните на ЦНС действа като невромедиатор и участва в процесите на паметта, контрола на невроналната активност и кръвния ток, модулирането на болката.

В.1. Киоторфинови дипептидни и Тур-MIF-1 аналози - Инхибиторите на NO предизвикват антиноцицептивен ефект, които се реверсира от L-arginine и от донорите на NO. В аналгетичното действие на Куо, Тур-Cav, Тур(Cl₂)-Cav, Leu-sArg, Тур-sArg или Тур-MIF-1 участва азотния оксид. Претретирането на изследваните пептиди с L-NAME - инхибитор на NO-синтазата (NOS), потенцира достоверно аналгетичните им ефекти (статия № 2, 7).

В.2. Новосинтезирани N-модифицирани с α -аминофосфонови киселини Arg-Тур-Тур-Arg-Trp-Lys-NH₂ аналози - Изследваните аналози на Ac-Arg-Тур-Тур-Arg-Trp-Lys-NH₂ – 2, 3, 4 и 6 подтиснаха мощният противоболков ефект на L-NAME и L-arginine, което говори за вероятно антиопиоидно действие на изследваните пептиди и участие на азотноокисната система в техните противоболкови ефекти (статия № 27).

Г. Вторични посредници - Methylene blue (MB), инхибитор на гуанилатциклазата и NO-синтазата) широко използван за инхибиране на cGMP-медираните процеси обръща аналгетичните ефекти на изследваните вещества в статистически значима хипералгезия, което показва, че ефектите на пептидите са медицирани и от вторичните посредници.

Получени от нас резултати показаха, че в антиноцицептивните ефекти на Тур-MIF-1, Куо, Тур-Cav, Тур(Cl₂)-Cav, Leu-sArg и Тур-sArg участват опиоидергичната хистаминергичната-, азотноокисната системи и вторични посредници. Може да се допусне, че в аналгетичните ефекти на изследваните пептиди се включват спинални и супраспинални регулаторни механизми. Известно е, че Тур-K-MIF-1 има малка активност към опиоидното свързване, докато Тур-W-MIF-1 действа като смесен μ_2 -опиод рецепторен агонист и μ_1 -опиод рецепторен антагонист. Нашите данни показаха, че Тур-K-MIF-1 въведен в интактни животни има по-добре изразен аналгетичен ефект в сравнение с Тур-W-MIF-1. (статия № 7).

Д. Адренергична невромедиаторна система - В изследвания *in vivo* бе установено, че α_2 -антагонистът yohimbine (Yoh), блокърът на невроналното поемане desipramine (Des) и α_2 -агонистът clonidine (Clo) подтискат в различна степен аналгетичните ефекти на Тур-W-MIF-1 и Тур-K-MIF-1. Получените резултати показват, че опиоидните пептиди Тур-W-MIF-1 и Тур-K-MIF-1 модулират адренергичната невромедиация чрез α_2 -адренорецепторите. Взаимодействието на μ_1 - и α_2 -рецепторите се осъществява най-вероятно на пресинапсно ниво. Тъй като α_2 и μ -рецепторите са негативно свързани чрез G протеин с N-тип калциеви канали, може да се предположи, че Clo и Des потенцират ефектите на Тур-W-MIF-1 и Тур-K-MIF-1 чрез намаляване на калциевото навлизане в клетката (статия № 14).

2. Проучено е влиянието на ендогенния пептид MIF-1 при фетален алкохол синдром (FAS)

При пре- и постнаталното излагане на действието на етанол (FAS) сред родените много често се срещат индивиди с "поведенческа тератогенност" - феномен включващ отклонения от нормалното психическо и мозъчно развитие със съответната поведенческа изява. Измененията в поведенческите прояви и по-специално в паметовите процеси се дължат и на промените в холинергична, допаминергична и адренергична системи.

При животните с FAS най-елементарните процеси на запаметяване са значително увредени. MIF-1 е хипоталамичен пептид, модулиращ активността на допамин-, холин-, опиоид- и норадренергичната невромедиаторни системи. Той оказва благоприятен ефект при редица неврологични дисфункции и психични разстройства (алкохолизъм, паркинсонизъм, шизофрения, и др.) при които се наблюдават абнормални промени в чувствителността на централните допаминови рецептори.

Получени са оригинални данни имащи пряко отношение както към патогенезата, така и към терапията на FAS. Показана е водещата роля на пептидергичните невромодулаторни механизми в контрола и функциите на ЦНС при нарушени ноцицептивни и когнитивни процеси при фетален алкохолен синдром.

За първи път в опити *in vivo* бе показано, че MIF-1 повишава болковия праг на плъховете с FAS, значително подобрява процесите на хабитуация, както и упражнява положителен ефект върху увредените процеси на запаметяване (метод за обучение за активно двупосочно избягване - shuttle box). Тези положителни промени по всяка вероятност са свързани с модулирането на допамин-, опиоид- и адренергична невромедиаторни системи от MIF-1. От друга страна L-NAME драстично влошава процесите на запаметяване при животните с FAS, което е свързано с промените предимно в холинергичната система (статия № 4, 5).

3. Проучена е невромодулаторната роля на аминокиселини, опиоидни пептиди и аналози при пентилентетразолов модел на епилепсия

Гърчовите пристъпи са една от най-ярките изяви на сериозни функционални, а често и на установими структурни нарушения в мозъка. Те са типичен симптом на епилепсията, но придружават и други неврологични заболявания, интоксикации, мозъчни травми и др.

Пентилентетразоловите гърчове се разглеждат като модел, в който първоначално се нарушава функционирането на подкоровите структури, с последващо генерализиране на процеса в мозъка. Този модел се използва при установяване на антиконвулсивни ефекти на изследвани вещества.

В патофизиологията на епилепсията през последните години е доказано участието на ГАМК-ергичната невротрансмисия. Известно е, че MIF-1 антагонизира действието на блокерите ГАМК-синтезата. Ефектите на MIF-1 наподобяват ефектите на ендогенните опиоидни антагонисти, които играят роля при модулиране на гърчовата активност. Опиоидните пептиди по доза-зависим начин подтискат гърчовата активност. Киоторфина също оказва влияние върху ГАМК-ергичната невротрансмисия. Опиоидните рецептори са въввлечени в епилептичните гърчове по различен начин, взаимодействайки с различни невротрансмитерни системи, в различни мозъчни зони.

В изследвания *in vivo* бяха установени противогърчовите ефекти на аминокиселината L-

Cav, както и на кинорфина и неговите аналози Туг-Cav и Туг(Cl₂)-Cav, които се потенцираха от Leu-Arg (рецепторен антагонист на Куо) (статия № 8).

II. Изучени и сравнени са някои параметри на остър (едночасов) стрес при три модела – имобилизационен (IS), студов (CS) и топлинен (HS) стрес

Въпреки многобройните публикации посветени на стреса и стрес-индуцираните заболявания, все още няма приета единна научна дефиниция за стрес. В литературата той най-често се дефинира като състояние застрашаващо хомеостазата или дисхармония на която организма противодейства с комплекс от физиологични и поведенчески отговори, които възстановяват равновесното му състояние (адаптивен стрес отговор).

Днес е известно, че стресът предизвиква отделяне на опиоидни пептиди, водещи до антиноцицептивни ефекти. Този важен феномен е свързан с болковата перцепция, а също така и с модуляцията на поведенческите отговори. Аналгезията предизвикана от стрес е наречена стрес-индуцирана. Тя се наблюдава при много видове животни, като стресовите фактори могат да бъдат различни – имобилизация, ниска или висока температура, социални стресори. Предполага се, че този феномен има адаптивен характер.

1. Определено е съотношението между опиоидната и неопиоидната компонента в три модела на стрес-индуцирана аналгезия

Според последни литературни данни, стрес-индуцираната аналгезия категоризирана като опиоидна и неопиоидна не съществува в чист вид. Тя основно има смесен характер и се състои от опиоидна и неопиоидна компоненти, но в различно съотношение.

В нашите експерименти на животни подложени на различни стресогенни фактори (имобилизация, висока (38°C) или ниска (4°C) температура). 20 мин преди или веднага след съответната стрес-процедура бе въведен налоксон, след което бе измерван болковия праг. Резултатите показаха, че опиоидната и неопиоидната компонента имат различно участие във всеки един от моделите на стрес, което потвърди различното съотношение опиоидна/неопиоидна компонента в стрес-индуцираната аналгезия. Неопиоидната система участва предимно при CS, опиоидната – при HS, докато двете системи са приблизително еднакво застъпени при IS (статия № 18).

2. Проучени са промените в плазмените нива на аденокортикотропния хормон и кортикостерона по време на три различни модела на стрес

Основният невроендокринен механизъм при стрес е активирането на хипоталамо-хипофизо-адреналната (HPA) ос, което е резултат от остро по качване на циркулиращият адренокортикотропен хормон (АСТН) и последващото качване на глюкокортикоидите, които са решаващи за успешна адаптация на организма при един или друг стрес. Съгласно литературни данни, АСТН, както и глюкокортикоидите са едни от индикаторите на стреса.

Радиоимунологични изследвания показаха, че трите модела на стрес - IS, CS и HS, повишават статистически достоверно нивата на АСТН и кортикостерон (CORT) в плазмата, като най-силни стресори са имобилизацията и високата температура. Студовият стрес показва най-слабо влияние върху плазмените нива на двата изследвани хормона. Резултатите потвърждават литературните данни за специфичността на стрес-

реакцията, която зависи от характера на стресора (*статия № 16*).

3. Проучени са промените в експресията на азотноокисната синтаза и тирозинхидроксилазата в PAG на плъх в резултат на студов, имобилизационен и топлинен стрес

След хисто- и имунохистохимични процедури бяха сравнени резултатите получени за експресията на имунореактивни неврони за азотноокисна синтаза (NOS) и тирозинхидроксилазата (TH) в periaqueductal gray (PAG) след три модела на стрес - IS, CS и HS. Най-голяма експресия на имунопозитивни неврони за ензимите отговорни за синтез на NO и катехоламините бе отчетена при топлинния, а най-малка при студовия стрес, което още веднъж потвърждава, че всеки стресор е строго специфичен и със свой „неврохимичен” почерк (*статия № 15*).

III. Проучени са антиопиоидните и антистресорни ефекти на пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 и техни аналози

Литературни данни показват, че членовете от пептидното семейство на Tyr-MIF-1 (MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1) са ендогенни опиоидни модулатори. За тях е характерно, че в отличие от повечето опиоид-модулиращи пептиди, те се свързват както с μ -опиоидни рецептори, така и със собствени неопиоидни места. Tyr-MIF-1 пептидите са способни да блокират опиоид-подобни ефекти при специфични тест-системи: потискат морфиновата аналгезия и някои форми на аналгезия провокирана от стрес (стрес-индуцирана аналгезия, SIA), понижават толерантността към леворфанол, провокират синдром на абстиненция при мишки със зависимост към морфин.

1. Изучени са ефектите на Tyr-MIF-1 пептидите върху опиоидните ефекти на морфин, L-NAME и стрес - В опити *in vivo* установихме, че пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 антагонизират противоболковия ефект на морфина и аналгезията придизвикана от L-NAME при остра болка, с участието на механо- и терморелепторите. Също така пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 показаха изразени противоболкови ефекти при въвеждането им след имобилизационен стрес. Въведени след три различни модела на стрес – едночасов или двучасов имобилизационен, студов или топлинен стрес, изследваните невропептиди MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1 понижават достоверно, но в различна степен SIA (*статия № 7, 9, 10, 39, 42*).

2. Изучени са ефектите на Tyr-MIF-1 пептидите върху плазмени нива на адренокортикотропин (ACTH) и кортикостерон (CORT) при стрес - В опити *in vivo* и *in vitro* за първи път бе показан антистресорният ефект на четирите пептида от семейството на Tyr-MIF-1, т.е. подтискащото им влияние върху увеличените след стрес плазмени нива на ACTH и CORT (*статия № 16*).

3. Изучено е участието на различни невромедиаторни системи и вторични посредници в ефектите на Tyr-MIF-1 пептидите и техни аналози при стрес

A. Опиоидергична невромедиаторна система - Опиоидергичната система и

вторичните посредници са въввлечени в механизма на тяхното действие, тъй като претретирането с налоксон или МВ повлиява инхибиторният ефект на пептидите върху SIA (статия № 9, 18).

А.1. Изучени са ноцицептивните ефекти на новосинтезирани Туг-MIF-1 аналози: Изследван беше болковия праг при въвеждане в опитни животни на Туг-Cit-MIF-1 и Туг-Cav-MIF-1 при различни видове стрес (имобилизационен, студов, топлинен), както и участието на опиоидергичната система. Получените резултати показваха, че Туг-Cit-MIF-1 и Туг-Cav-MIF-1 в различна степен подтискат стрес-индуцираната аналгезия. Най-изразен бе ефектът при топлинната SIA, където и претретирането с NaI доведе до пълна редукция на аналгетичните им ефекти (статия № 20).

А.2. Изучени са ноцицептивните ефекти на новосинтезирани енкефалинови аналози - Енкефалините притежават опиоидподобно действие и въздействат върху активността на неврони носители на опиоидни рецептори, като по този начин участват в своеобразна хомеостатична система регулираща ефектите им. Изследванията показват, че вмъкването на Cys(O₂NH₂) във втора позиция в молекулите на Leu⁵-енкефалина води до значително нарастване на активността и селективността по отношение на δ-опиоидните рецептори и на тяхната устойчивост към пептидази. Следователно, линейни енкефалини съдържащи модифициран цистеин могат да служат като изходна точка за дизайн на селективни агонисти с оглед създаването на нови терапевтични съединения с аналгетични свойства. В опити *in vivo* беше изучено влиянието на [Cys(O₂NH₂)²]-enk върху ноцицепцията, предизвикана от едновременно имобилизационен, студов и топлинен стрес. Резултатите показваха, че новосинтезираният аналог [Cys(O₂NH₂)²]-enk (0,2 mg/kg i.p.) притежава по-голям аналгетичен ефект от този на нативния Leu-enk. Въведени след SIA в резултат на всеки един от моделите на стрес и двата пептида понижават болковия праг и НР-латентността, като този ефект е по силно изразен за [Cys(O₂NH₂)²]-enk. Механо- и терморекцепторите са въввлечени по различен начин в ноцицептивните ефекти на Leu-Enk и [Cys(O₂NH₂)²]-enk след едновременно модел на стрес (статия № 41).

Б. Адренергична невромедиаторна система - Известно е, че опиоидните пептиди по време на стрес могат да инхибират норадреналиновото отделяне в някои зони на мозъка, което води до понижаване на норадренергичната им активност. Съществуват противоречиви данни за ролята на α₂-адренорецепторите в медирането на аналгезията. Някои автори показват, че α₂-агонистът клонидин (Clo) предизвиква спинална антиноцицепция при животински модели взаимодействия с опиоидни аналгетици чрез синергизъм или антагонизъм. Известно е, че Clo индуцира антиноцицепция чрез активиране на низходящата норадренергична инхибиторна система и чрез инхибиране на синаптичната трансмисия в задния рог на гръбначния мозък като активира спиналните холинергични неврони. Други автори показват, че Clo наподобява ефекта на норадреналиновия рилиз чрез низходящи инхибиторни ноцицептивни контролни пътища.

В експерименти *in vivo* нашите резултати показваха, че съвместното въвеждане на Туг-MIF-1 пептидите с Clo, Yoh или дезипрамин Des, понижават SIA по-различен начин. Най-силно изразен е ефектът на съвместното въвеждане на Туг-K-MIF-1 с Clo, Yoh или Des при НР теста, където подтискането води до хипоалгезия. От една страна, това би могло да бъде обяснено с различната степен на взаимодействие на пептидите с μ- и α₂-рецепторите, което се осъществява на пресинапсно ниво, свързано с G_i-протеините и калиевите канали,

които предизвикват хиперполяризация на нервните терминали и инхибиране на невротрансмитерното освобождаване. От друга страна влияние върху участието на адренергичната система в антиноцицептивните ефекти на четирите Туг-MIF-1 пептида при различните модели на стрес може би има тяхната структура, и различното взаимодействие с компонентите на SIA - опиоидна и неопиоидна (*статия № 14*).

4. Изучени са ефектите на неuropeптиди и техни аналози върху плътност и локализация на TH и на NOS в някои мозъчни структури

Известно е, че по време на стрес се активира хипоталамо-хипофизо-адреналната (HPA) ос. Променя се нивото на катехоламините, стимулира се експресията на ензима тирозинхидроксилаза, отговорен за тяхната синтеза. Също така, има данни, че NO играе важна роля при регулиране отговора на HPA ос към различни стресори. Редица експерименти показват, че азотноокисната система отговаря на всички изисквания за стрес-лимитираща система.

4.1. Изучено е влиянието на опиоидни пептиди и техни аналози върху NADPH-d реактивни неврони в някои мозъчни структури - Получените резултати показаха, че MIF-1 и Туг-MIF-1 намаляват броя на увеличените от стреса NADPH-d реактивни неврони (хистохимичен маркер за нитрергични неврони) в някои мозъчни структури на плъх. Според хистохимичните изследвания Куо и неговия синтетичен аналог D-Куо повишиха броя и плътността на NADPH-d реактивни неврони в паравентрикулярното ядро на хипоталамуса (*статия № 23*), в PAG (*статия № 15, 20, 22, 26*), стриатум и caudate putamen, мозъчна кора (*статия № 28, 29, 30*).

4.2. Изучено е влиянието на Туг-MIF-1 пептидите и техни новосинтезирани аналози: Туг-Cit-MIF-1 и Туг-Sav-MIF-1 върху експресията на TH и NOS - Получените резултати показаха, че Туг-MIF-1 пептидите, Туг-Cit-MIF-1 и Туг-Sav-MIF-1 намаляват увеличената от стреса плътност на TH и NOS в PAG. Избраната мозъчна структура е една от основните свързана със стрес-индуцираната аналгезия и стимулирането на опиоидните рецептори в нея активира низходящите опиоидни и норадренергични инхибиторни пътища, подтискащи ноцицепцията (*статия № 15, 24*).

4.3. Изучена е плътността на СВ₁ канабиноидни рецептори след имобилизационен стрес в префронтална кора на плъх

Медиалната префронтална кора е свързана с контрола върху отговора към стрес и е структура повлияваща хипоталамо-хипофизо-адреналната ос. Изследвахме повлияването на ендогенната канабиноидна система от остър имобилизационен стрес. Имунохистохимичните резултати показаха, че този модел на стрес повишава плътността на СВ₁ рецепторите в невроналните елементи на префронтална кора на плъх (*статия № 35*).

IV. Микродиализно изследване върху освобождаването на ацетилхолин (ACh) от хипокамп и стриатум на плъх

По литературни данни холинергичната система в хипокампа е свързана с когнитивните функции, докато в стриатума холинергичните интерневрони участват в регулирането на моторната дейност. Освен това взаимодействието между

холинергичната и глутаматергичната невротрансмитерни системи не е напълно проучено. Основният холинергичен път към хипокампа е септо-хипокампаалния. Освен това съществува и глутаматергичен хипокампо-септален. Съществуват противоречиви данни за глутаматергичната модулация на септо-хипокампаалния холинергичен път от NMDA и не-NMDA рецепторите.

В *in vivo* експерименти чрез микродиализна техника (HPLC) регистрирахме потока на отделения ендогенен ацетилхолин от хипокампа и стриатум като индекс на функционална активност на холинергичните неврони. Изучихме и ефекта на локално приложени глутаматергичен агонист на не-NMDA рецепторите (QUIS) и AMPA рецепторен антагонист 1-(aminophenyl)-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepine (GYKI 52466), който селективно блокира не-NMDA рецептор-медираното възбуждане в мозъка. Установихме, че GYKI 52466 блокира quisqualate-индуцираното освобождаване на Ach от хипокампа и стриатум на плъх и показахме, че хипокампаалната и стриатална холинергични системи се регулират от не-NMDA, вероятно AMPA глутаматергични рецептори локализиращи в хипокампа и стриатума (статия № 1).

ПРИНОСИ С КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ

I. Изследвани са новосинтезирани пиролови продукти с потенциално клинично приложение, отнасящи се към групата на нестероидните противовъзпалителни средства (NSAID)

За първи път е установено, че серия от 9 новосинтезирани пиролови продукти, които се отнасят към групата на нестероидните противовъзпалителни средства (NSAID) имат както аналгетично, така и противовъзпалително действие. Известно е, че NSAID оказват своя аналгетичен, противовъзпалителен и антипиретичен ефект чрез блокиране на ензима циклооксигеназа. В нашите опити беше използван карагенин, който предизвиква остро ексудативно възпаление, ускоряващо образуването на метаболити на арахидоновата киселина във възпалителното огнище. През първия час (начална фаза) в патогенезата на карагениновия оток участват хистамин и серотонин, след това повишената съдова пропускливост е медирана от брадикинина и през четвъртия час (крайна фаза) в острата възпалителна реакция се включват простагландините. Потискането на тази фаза на карагениновия оток корелира в голяма степен с терапевтичната ефективност на противовъзпалителните средства при ревматоидните заболявания. Характерно за NSAID е потискането именно на тази късна фаза (статия № 11).

II. Изследвано е влиянието на статично магнитно поле върху някои маркери на възпалението и стреса

Магнитотерапията представлява безопасен метод на използване на магнитните полета за терапевтично въздействие на организма. Магнитотерапията се използва особено ефективно при отстраняване на неприятните усещания при болка в ставите и мускулите, при възпаления и спазми. Клиничните проучвания показват, че прилагане на статично магнитно поле със сила от

700 до 1 000 Гауса върху тялото води до значително облекчаване на болката.

Всички физически и умствени функции на човешкия организъм се контролират с помощта на електромагнитни полета, които се образуват вследствие на движението на йони в организма. Магнитното поле спомага за разширяване на стените на капилярите и в резултат на това се стимулира кръвообращението.

Поразеният участък получава повече кислород и хранителни вещества. Същевременно изчезва ефектът на болката и се отстраняват електрохимичните вещества, образувани в резултат на възпалението. В крайна сметка, в този участък се възстановява нормалния електромагнитен баланс, болката и възпалението изчезват и това спомага за ускоряване на възстановителния процес.

Еднополюсните магнити са поляризирани с отрицателни полета от едната страна на магнита и положителни на другата. При двуполусните магнити присъстват и двете полета на всяка страна.

В нашите експерименти установихме, че излагането на опитните животни на действието на статично магнитно поле (SMF, $B = 25 \text{ mT}$) за 30 мин намалява процеса на карагинин-предизвикано възпаление и намалява нивото на стрес маркерите АКТН и кортикостерон в плазмата (статия № 19).

III. Изследвана е ролята на NO в патогенезата на гонартрозата и потенциалната възможност за ранната ѝ диагностика по количеството NADPH-d реактивни клетки.

Гонартрозата е прогресивно хронично дегеративно (разрушаващо) възпаление на колянната става. Хрущялът, който покрива костите се възпалява, дегенерира, става груб и втвърден и в крайна сметка се износва. В по-късните етапи на заболяването могат да се образуват и шипове. Всичко това е свързано с болка при раздвижване, подуване и оток. Сухожилията и мускулите, които поддържат ставата отслабват, причинявайки деформация и намалено движение.

Счита се че свръхпродукцията на интерлевкин-1(IL-1) от възпаления хрущял е основен в патогенезата на ставните заболявания и един от най-забележимите ефекти на хондроцитите е индуцирането на NOS. В нашите изследвания използвахме хрущялна тъкан от хора с и без гонартроза (от трупове или пациенти претърпяли хирургични операции на коляното). Чрез хистохимичен метод определихме количеството NADPH-d реактивни клетки (маркери за активността на NOS) в приготвените препарати. Данните ни показаха, че нормалният хрущял е по-плътен от дегенериралият. Количеството, разпределението и струпванията на NADPH-d реактивни клетки в хората с гонартроза е повишено в сравнение с нормалния коленен хрущял. Освен това степента на дегенеративни промени в клетките на екстрацелуларния матрикс бе по-добре изразена в сравнение с нормата. Тъй като изследванията ни показаха, че броят на NADPH-d реактивните клетки нараства паралелно със степента на гонантроза, той би могъл да се използва като маркер за ранна диагностика и лечение на много ставни заболявания (статия № 21).