



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ

ЕЛИНА РУМЕНОВА ЦВЕТАНОВА

**ВЛИЯНИЕ НА НОЦИЦЕПТИН И НЕГОВИ
СТРУКТУРНИ АНАЛОЗИ ВЪРХУ КЛЕТЪЧНИЯ
АНТИОКСИДАНТЕН СТАТУС**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Научна специалност: „Фармакология”, шифър 03.01.24

Научни консултанти: Доц. д-р Албена Александрова

Доц. д-р Росица Замфирова

Официални рецензенти:

София

2014 г.

Дисертационният труд се състои от 128 стандартни страници, 24 фигури, 13 схеми и 9 таблици. Списъкът с цитираната литература включва 277 заглавия.

Дисертационния труд е обсъден и предложен за защита на научен семинар на Института по невробиология – БАН, състоял се на 08.07. 2014 г.

Публичната защита на дисертационният труд ще се състои на2014 г.в заседателната зала на Института по невробиология при БАН, ул. „Акад. Г. Бончев” бл. 23, ет. 2, на открито заседание на Научното жури. Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на Института по невробиология на БАН, ул. „Акад. Г. Бончев” бл. 23, ет. 2.

Списък на използваните съкращения

N/OFQ	ноцицептин/орфанин
NOP	ноцицептинов рецептор
Orn	орнитин
Dab	диаминобутанова киселина
Dap	диаминопропанова киселина
Cav	канаванин
SOD	супероксид дисмутаза
Glu-6-P-DH	глюкозо 6 фосфат дехидрогеназа
GSH-Px	глутатионпероксидаза
GSSG	окислен глутатион
GSH	редуциран глутатион
GSSG-Red	глутатионредуктаза
CAT	каталаза
CG	карагенан
KA	каинова киселина
LP	липидна пероксидация
Lys	лизин
Arg	аргинин
MDA	малонов диалдехид
TBA	тиобарбитурова киселина
TBARs	тиобарбитурова киселина-реагиращи субстанции
АФК	активни форми на кислорода
ЛХП	липидни хидропрекиси
ПОЛ	прекисно окисление на липидите
ПНМК	полиненаситени мастни киселини
ЦНС	централна нервна система
COX	цикооксигеназа
NADPH	никотинамид динуклеотидфосфат (редуциран)
NMDA	N-метил D-аспартат
cAMP	цикличен аденозин моно фосфат
PMNs	полиморфонуклеарни левкоцити
fMLP	формил метионин-левцин-фенилаланин
CGPR	калцитонин ген свързан пептид
SP	субстанция P
DTPA	диетилен триамин пентаацетилова киселина
DR	дезоксирибоза
i.c.v	интрацеребровентрикуларно въвеждане
i.pl	интраплантарно (подкожно) въвеждане
i.t	интратекално въвеждане

1. Въведение

При различни патологични състояния, генерирането на активни форми на кислорода (АФК) в организма се интензифицира и антиоксидантният капацитет на клетките може да се окаже недостатъчен, за да елиминира тяхната продукция и вредно действие. Това състояние на организма се означава като оксидативен стрес (ОС).

Ноцицептинът (N/OFQ) е невропептид, състоящ се от 17 аминокиселини и е ендогенен лиганд на ноцицептиновите рецептори (NOP). N/OFQ/NOP системата е представена в централната и периферната нервна система.

В литературата съществуват данни за наличие на връзка между N/OFQ и ОС. Установено е, че концентрацията на N/OFQ в мозъчната течност след травматично увреждане на мозъка е увеличена, което допринася за увеличаване на продукцията на супероксидни радикали (O_2^-), свързано с активирането на индуцибилната циклооксигеназа (COX-2). Той също увеличава протеинкиназа C - зависимата продукция на O_2^- след мозъчна исхемия. Открито е, че АФК, генерирани в астроцитни култури, подложени на исхемия и последваща реоксигенация или третирани с H_2O_2 , индуцират експресията на двата невропептидни гена: опиоид проенкефалин и опиоид-свързания проорфанин (също известен като проноцицептин). Силното индуциране на тези гени от ОС предполага ролята на N/OFQ и енкефалина при травми и стрес-отговори на ЦНС и невропатологични условия, включващи АФК. Въпреки установената връзка, публикуваните досега изследвания отразяват взаимодействието между тях само частично, като данните за про/антиоксидантните свойства на ноцицептина са сравнително оскъдни.

Като имахме предвид установения модулиращ ефект на невропептида при патологични състояния, съпътствани от повишена продукция на АФК, възниква въпросът дали част от ефектите му не се реализират чрез промяна на антиоксидантния статус на клетките.

В настоящата работа са изследвани N/OFQ(1-13)NH₂ и аналози, в които аминокиселината лизин на позиция 9 от молекулата е заменена съответно с орнитин (Orn), диаминопропанова киселина (Dap), диаминобутанова киселина (Dab) и канаванин (Cav). Модификациите са направени, за да се получат по-устойчиви на протеолитично разграждане съединения, които имат висока

активност и селективност по отношение на ноцицептиновите рецептори. Тези техни характеристики ги правят необходими и важни средства при изследване на ефектите на N/OFQ/NOP системата в организма. Изясняването на свойствата на тези аналози и по отношение на антиоксидантния им капацитет е от съществено значение. Обобщените резултати и направените изводи биха могли да допълнят характеристиката за ноцицептина и новосинтезираните аналози и да дадат нови знания относно клетъчните им механизми на действие.

2. Цели и задачи

Основна цел на настоящата работа беше да се проучат и сравнят:

1. Антиоксидантния капацитет на ноцицептина N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите структурни аналози [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂.

2. *In vitro* и *in vivo* ефектите на ноцицептина и неговите аналози върху клетъчния антиоксидантен статус в мозък, черен дроб, кръв и лапа на плъх в норма и патология.

За изпълнението на целите бяха поставени следните задачи:

1. Използвайки химични системи за генериране на свободни радикали (O₂⁻ и HO[•]) да се изследва антиоксидантният капацитет на ноцицептина и аналозите му.

2. Да се изследват *in vitro* ефектите на ноцицептина и аналозите му върху клетъчния оксидативен статус и по-точно: нива на липидна пероксидация (LP), нива на общ глутатион (GSH) и активност на антиоксидантни ензими: супероксид дисмутаза (SOD), глутатион редуктаза (GSSG-Red), глутатион пероксидаза (GSH-Px) и глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа (Glu-6-P-DH) в мозък и черен дроб.

3. Да се изследват *in vivo* ефектите на ноцицептина и аналозите му върху ензимната и неензимна антиоксидантна защитна система при нормални (физиологични условия) в мозък, черен дроб, кръв и тъкан от лапа на плъх.

4. Да се изследват *in vivo* ефектите на ноцицептина и аналозите му върху клетъчните ензимни и неензимни антиоксиданти при патологични състояния, свързани с оксидативен стрес (при каинов и кагаренанов модел на възпаление) в мозък, черен дроб, кръв и тъкан от лапа на плъх.

5. Да се направи сравнителна оценка на ефекта на ноцицептина и аналозите върху про- и антиоксидантния статус в норма и патология в мозък, черен дроб, кръв и тъкан от лапа на плъх.

3. Материали и методи

3.1. Материали

3.1.1. Химикали и реагенти

N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите новосинтезирани структурни аналози [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ бяха синтезирани в катедра „Органична химия” към ХТМУ (София). [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ беше синтезиран в лаборатория „Молекулярен дизайн и биохимична фармакология” към ИМБ, БАН.

3.1.2. Експериментални животни

Опитите бяха проведени с мъжки бели плъхове, порода “Wistar” (160-200 гр.). До провеждането на експеримента те се отглеждаха при стандартни условия за отглеждане на експериментални животни. Плъховете бяха декапитирани под лека етерна наркоза. Експериментите бяха одобрени от етичната комисия към Института по невробиология- БАН, съгласно „Правилника за отглеждане и експериментална работа с лабораторни животни”.

3.1.3. Получаване на тъканни препарати

За провеждане на експериментите беше използван мозък, черен дроб, кръв и тъкан от лапа от плъх.

Мозъкът беше хомогенизиран в охладен 0.15 М KCl-10 mM K-PO₄(pH 7.4) и центрофугиран (10 мин; 3000 об/мин). Полученият постядрен хомогенат беше използван за количествено определяне на нива на GSH и LP. Част от пост ядрения мозъчен хомогенат беше центрофугиран за 20 мин на 12 000 об/мин и получената супернатанта беше използвана за измерване на активностите на ензимите.

Черният дроб, перфузиран *in situ* с охладен 0.15 М KCl, беше хомогенизиран с тefлонов пестик в стъклен хомогенизатор. 10% чернодробен хомогенат (тегло/обем) беше центрофугиран за 10 мин. при 3000 об/мин. и температура 0-4 C. Част от получения постядрен хомогенат се използваше за измерване на LP и нива на GSH, а останалата част беше центрофугирана 20 мин. на 12 000 об/мин за получаване на постмитохондриална супернатанта за измерване на ензимните активности.

Кръвта беше взимана с хепаризирана спринцовка чрез пункция от лява сърдечна камера. Еритроцитите бяха получени след центрофугиране на 600 g за 10 мин. Плазмата беше отделена, а червените кръвни клетки промити 2 пъти с

0.9% NaCl и бяха центрофугирани при същите условия. 5% еритроцитна суспензия беше използвана за измерване на нивата на LP и GSH. Останалата част от 5% суспензия беше лизирана чрез замразяване на -20 C за 24 часа и използвана за измерване на ензимните активности.

Тъкан от лява и дясна лапа беше отделяна, хомогенизирана (при същите условия като черен дроб и мозък) и центрофугирана 10 мин на 3000 об/мин за получаване на постядрен хомогенат, който след допълнително зонифициране (4x30 сек) беше използван за биохимични анализи.

3.2. Методи

3.2.1. Определяне на белтък (Lowry et al., 1951).

3.2.2. Определяне на хемоглобин. „Меркотест” (кат. N 3317) със стандарт за калибриране „Мерк – стандарт” (кат. N3298).

3.2.3. Определяне на тотален глутатион (Tietze, 1969)

3.2.4. Определяне на прекисно окисление на липидите в хомогенати от мозък, черен дроб и тъкан от лапа (Hunter et al., 1963)

3.2.5. Определяне на прекисно окисление на липиди в кръв (Gilbert et al., 1984).

3.2.6. Определяне на активността на супероксид дисмутаза (Beauchamp and Fridovich, 1971).

3.2.7. Определяне на активността на каталаза (Aebi, 1970).

3.2.8. Определяне на активността на глутатионпероксидаза (Gunzler et al., 1972)

3.2.9. Определяне на активността на глутатионредуктаза (Pinto and Bartley, 1969)

3.2.10. Определяне на активността на глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа (Cartier et al., 1967)

3.2.11. Измерване на продукцията на хидроксилни радикали (TBA test) (Halliwell et al., 1988)

3.2.12. Измерване на продукцията на супероксидни радикали (NBT test) (Beauchamp & Fridovich, 1971)

3.3. Експериментални модели

3.3.1. Каинов модел

Каиновата киселина (КА) (0.25 мкг в 0.5 мкл физиологичен разтвор) и неuropeптидите (0.2 мкг в 0.5 мкл физиологичен разтвор) в животните от опитните групи, както и физиологичният разтвор (0.5 мкл) в животните от контролната група бяха въведени интрацеребровентрикуларно (i.c.v.) (Parihar et al., 2003) със стереотаксични координати: А-4.2, L \pm 3.0, V-2.3 (Paxinos & Watson, 1986). Разтворите на N/OFQ(1-13)NH₂, [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и КА бяха приготвяни непосредствено преди всеки опит. Стойностите на измерваните параметри при плъхове, третирани с физиологичен разтвор, бяха еднакви с тези при нетретирани животни, което ни позволи да приемем третираните с физиологичен разтвор за контроли.

При *in vivo* изследванията животните бяха разделени на следните експериментални групи:

- (1) контроли;
- (2) третирани с N/OFQ(1-13)NH₂;
- (3) третирани с [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂;
- (4) третирани с [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂;
- (5) третирани с [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂;
- (6) третирани с [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂;
- (7) третирани с КА;
- (8) третирани с N/OFQ(1-13)NH₂ 30 мин преди въвеждане на КА;
- (9) третирани с [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ 30 мин преди въвеждане на КА;
- (10) третирани с [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ 30 мин преди въвеждане на КА;
- (11) третирани с [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ 30 мин преди въвеждане на КА;
- (12) третирани с [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ 30 мин преди въвеждане на КА.

Групите бяха дублирани за изследване на ефекта на субстанциите при различна продължителност на третиране. Животните от първата серия бяха декапитирани 1 час след инжектирането на КА, а втората – 24 часа след инжектирането на КА.

При *in vitro* изследванията неuropeптидите в концентрации от 0.1 до 100 мкМ бяха инкубирани за 30 мин в мозъчен хомогенат, а при комбинацията с КА

бяха използвани съответно концентрации: 100 мкМ за неврпептидите и 1 мМ и 10 мМ за КА.

3.3.2. Карагенанов модел

За предизвикване на възпалителна реакция в лапа на плъх беше използван 1% разтвор на карагенан (CG) с разтворител 1% диметилцелулоза. CG беше инжектиран подкожно с обем 0.1 мл в дясната задна лапа. N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ (20 микрограма/мл) бяха инжектирани интраперитонеално в обем 0.1 ml/100 g тегло (Helyes et al., 1997).

Животните бяха разделени на следните експериментални групи:

- (1) Контроли;
- (2) третирани с N/OFQ(1-13)NH₂;
- (3) третирани с [Orn⁹] N/OFQ(1-13)NH₂;
- (4) третирани с CG;
- (5) Едновременно третирани с N/OFQ(1-13)NH₂ и CG;
- (6) Едновременно третирани с [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и CG;
- (7) Третирани с N/OFQ(1-13)NH₂ 15 мин преди CG;
- (8) Третирани с [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ 15 мин преди CG;

Четири часа след третирането с CG животните бяха декапитирани.

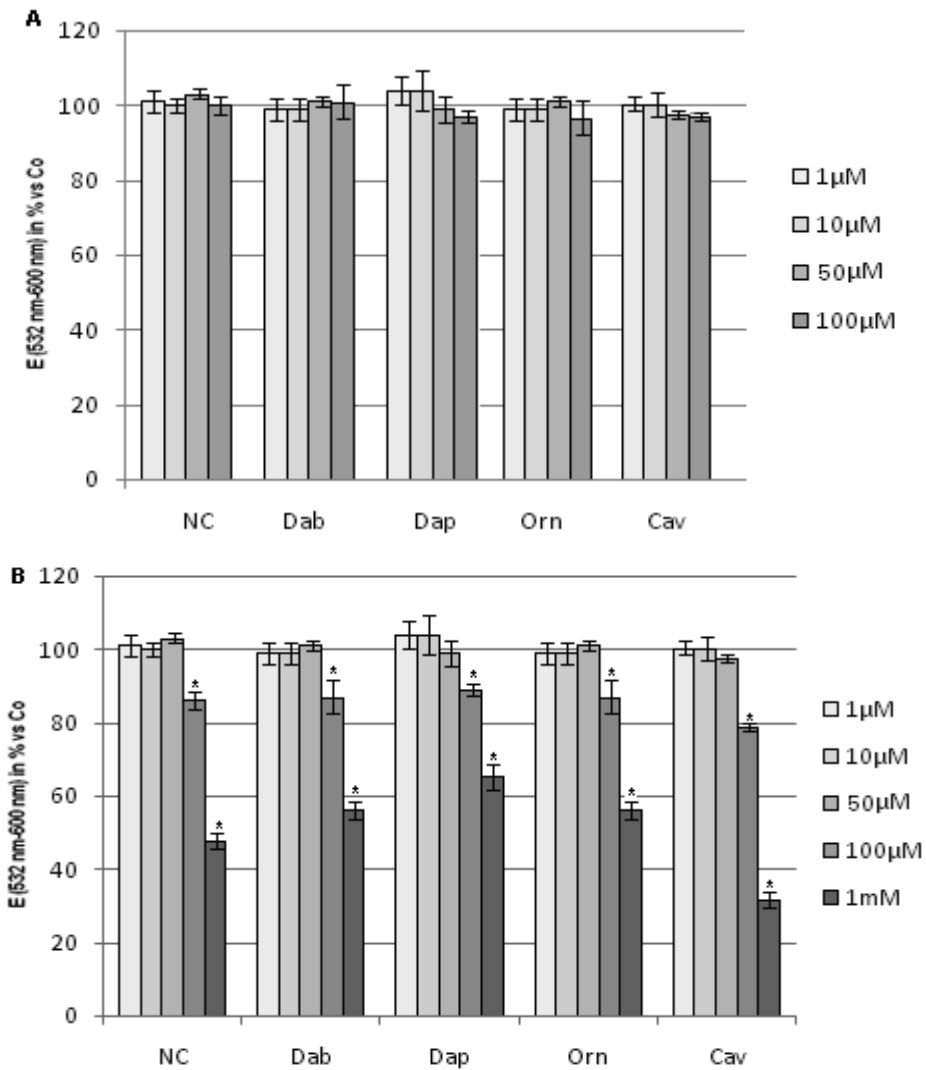
3.4. Статистическа обработка на получените резултати

Резултатите са изразени като средни стойности ± SEM. Статистическите анализи бяха проведени като се използва ANOVA, а за проверка на статистическата достоверност на получените разлики в средните стойности беше приложен тест на Dunnett за множествени сравнения на средните стойности.

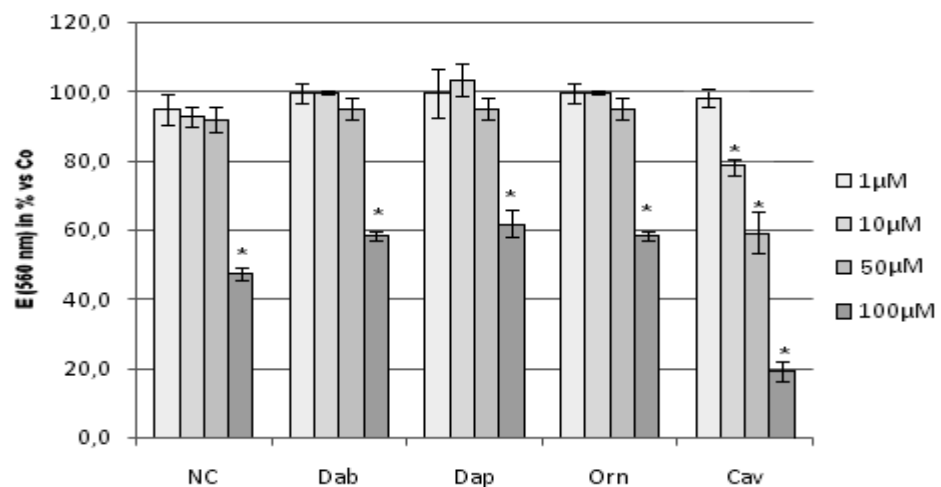
4. Резултати

4.1. Ефекти на ноцицептина и неговите структурни аналози в химически системи, генериращи O₂⁻ и HO[•] радикали

За установяване на антиоксидантните свойства на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите структурни аналози бяха проведени серия опити в химически системи, генериращи 1) HO[•] и 2) O₂⁻ радикали (Фиг. 1 и 2).



Фигура 1. Ефекти на N/O/FQ(1-13)NH₂ и неговите структурни аналози в система, генерираща HO[•] радикали: А) с DTPA и В) без DTPA



Фигура 2. Ефекти на N/O/FQ(1-13)NH₂ и неговите структурни аналози в система, генерираща O₂⁻ радикали.

Дезоксирибозният тест беше използван, за да се определи хелаторния или „scavenger” потенциал на изследваните пептиди. В нашия експеримент, в системата, генерираща HO^\bullet , в която присъства хелатор на метални йони, не бяха установени промени в степента на деградация на DR независимо от приложената концентрация на пептидите (Фиг. 1A). В отсъствие на ДТРА в инкубационната среда, в ниски концентрации нито един от тестваните пептиди не показва антиоксидантен ефект. При концентрация от 100 μM на изследваните вещества, деградацията на дезоксирибозата намалява с около 10 - 20% (Фиг. 1B). При прилагане на още по-висока концентрация (1 mM) „scavenger”- ефектът беше по-силно изразен като канаваниновият аналог показва най-висока ефикасност (70%) при неутрализиране на HO^\bullet радикалите в сравнение с другите пептиди (30-50%).

В система, генерираща O_2^- радикали, пептидите с изключение на канаваниновия аналог в концентрация от 0.1 до 10 μM не проявяват антиоксидантни свойства (Фиг. 2). При най-високата тествана концентрация (100 μM) всички изследвани невропептиди инхибират значително NBT-редукцията: $\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, $[\text{Dab}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ и $[\text{Dap}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ – с около 40-50 %, а $[\text{Cav}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ до 80%.

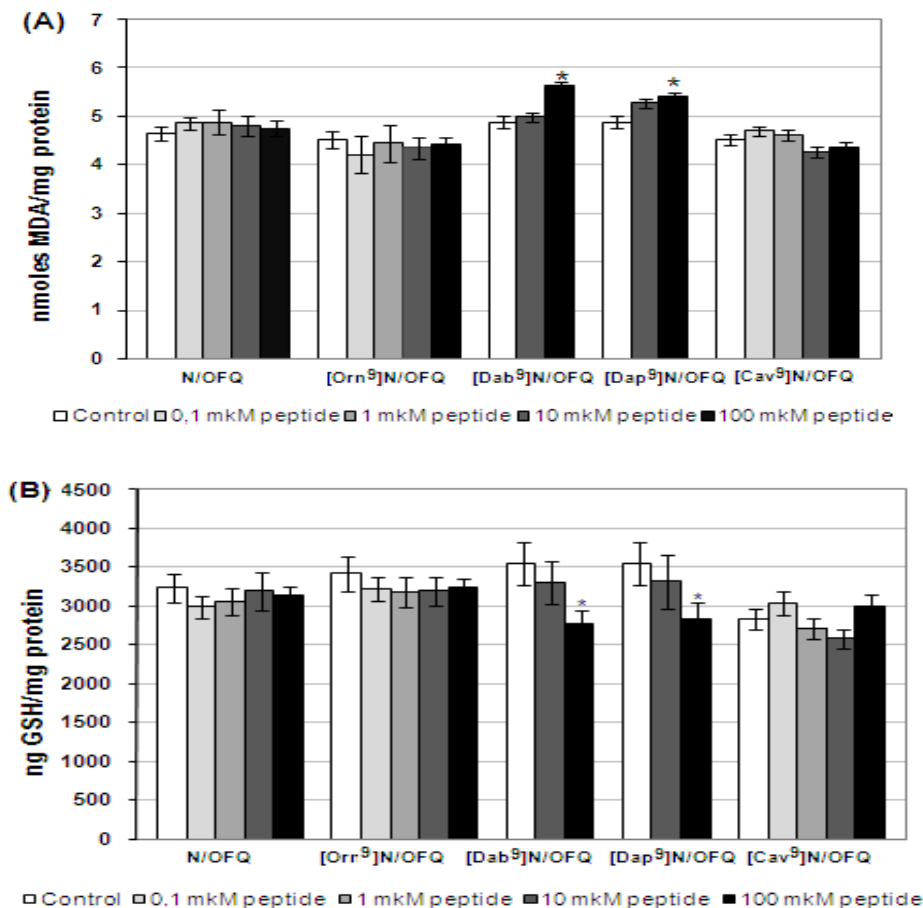
В заключение, всички изследвани съединения при високи концентрации (100 μM и 1mM) инхибират O_2^- предизвиканата редукция на NBT и HO^\bullet -предизвиканата деградация на DR в отсъствие на хелатор. Спрямо „scavenger”-ефекта си пептидите могат да бъдат класифицирани по сила както следва $[\text{Cav}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2 > \text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2 > [\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2 > [\text{Dab}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2 > [\text{Dap}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$. От тестваните пептиди единствено $[\text{Cav}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ демонстрира добра антиоксидантна активност, потискайки O_2^- предизвиканата редукция на NBT в концентрация 10 μM .

4.2. *In vitro* ефекти на ноцицептина и на неговите структурните аналози върху антиоксидантен статус на мозък на плъх.

Ефектите на $\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ и неговите структурни аналози върху оксидативния статус на мозък на плъх бяха изследване чрез *in vitro* прилагане на различни концентрации от невропептидите (0.1 – 100 μM) в хомогенат от цял мозък.

С изключение на $[\text{Dab}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ и $[\text{Dap}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, които в най-високата приложена концентрация увеличаваха количеството на MDA, останалите невропептиди не променяха нивата на LP във всички тествани

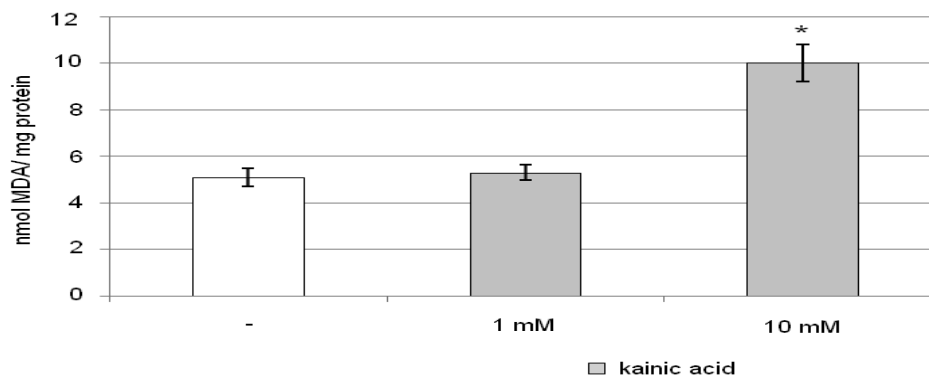
концентрации (Фиг. 3А). По отношение на нивото на глутатиона, само [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ в най-високата приложена концентрация намаляваха количеството му (Фиг. 3В).



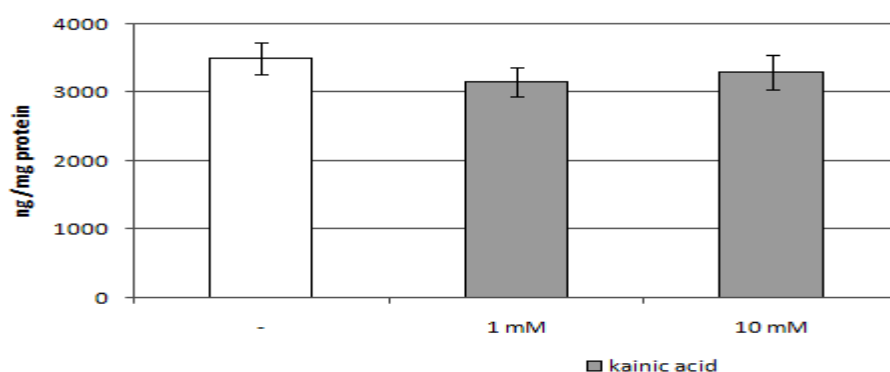
Фигура 3. *In vitro* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите структурни аналози в мозък на плъх (А)-нива на липидна пероксидация и (В)-нива на GSH.

Активността на антиоксидантните ензими не беше повлияна от приложените невропептидислед 30 мин инкубация при 37⁰С, независимо от концентрацията им в хомогената (данните не са показани).

Добре известно е, че КА генерира свободни радикали и предизвиква оксидативни промени в клетките, което дава възможност за изследване на антиоксидантния капацитет на различни субстанции. Добавянето на КА в концентрация 1 mM в хомогената не променя LP, но в концентрация 10 mM я удвоява (Фиг.4). Нивата на GSH и в двата случая останаха непроменени (Фиг. 5). Получените резултати ни дадоха основание да изберем концентрацията от 10 mM КА за последващите експерименти.

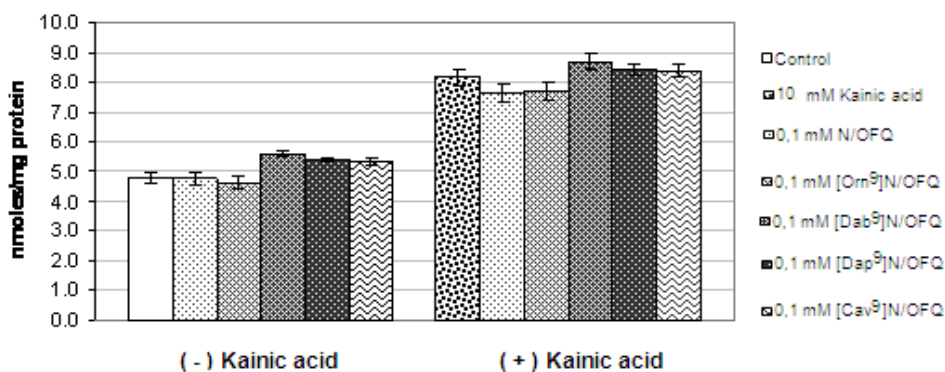


Фигура 4. *In vitro* ефект на КА в мозък на плъх- нива на LP



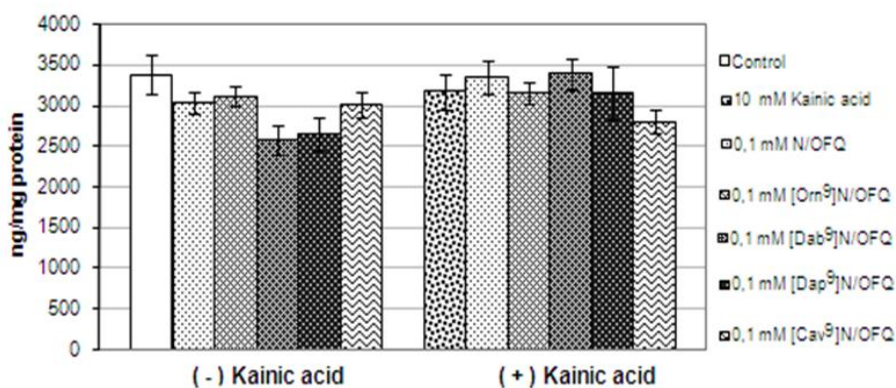
Фигура 5. *In vitro* ефект на КА в мозък на плъх- нива на GSH

При *in vitro* прилагане никой от невропептидите не намали КА-идуцираното увеличение на LP. В сравнение с КА-контрола, N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ показаха тенденция за намаляване на концентрацията на MDA, докато стойностите за [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ бяха по-високи, но не и статистически достоверни (Фиг. 6).



Фигура 6. *In vitro* ефекти на ноцицептина и неговите структурни аналози върху нива на LP в мозък от плъх без и в присъствие на КА

Не се наблюдаваха промени в нивата на глутатиона в присъствие на КА (Фиг. 7).

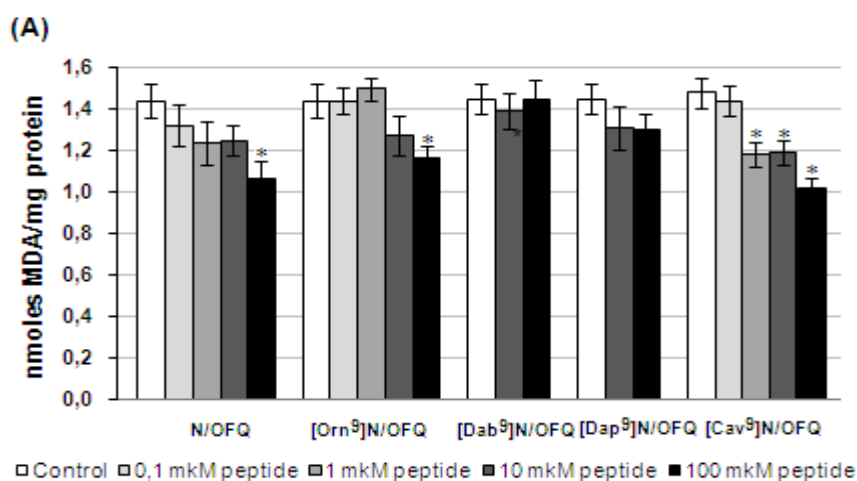


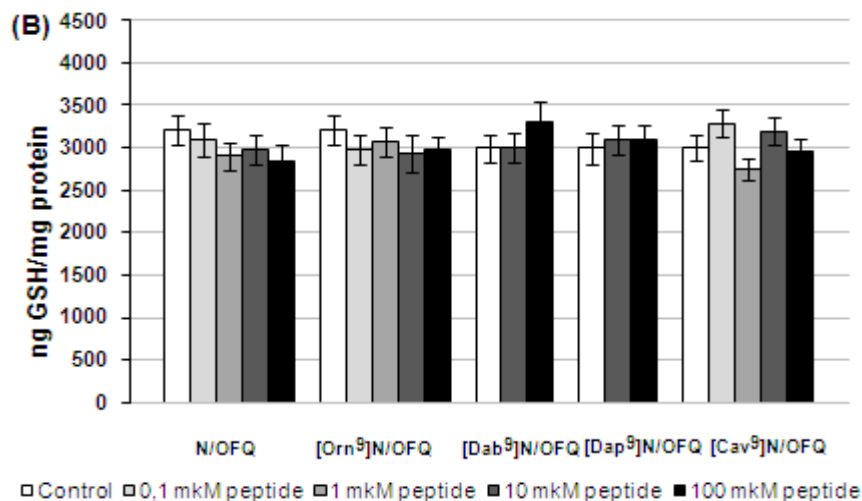
Фигура 7. *In vitro* ефекти на ноцицептина и неговите структурни аналози върху нива на GSH в мозък от плъх без и в присъствие на КА

Прилагането на комбинацията КА и невропептид в мозъчния хомогенат също не оказва ефект върху активността на антиоксидантните ензими (данните не са показани).

4.3. *In vitro* ефекти на ноцицептина и неговите структурни аналози върху антиоксидантния статус на черендроб на плъх

Резултатите от *in vitro* ефектите на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите структурни аналози върху нивата на LP и GSH в черен дроб на плъх са представени на Фиг. 8.





Фигура 8. *In vitro* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите структурни аналози в черен дроб на плъх (A) - нива на липидна пероксидация и (B)-нива на GSH.

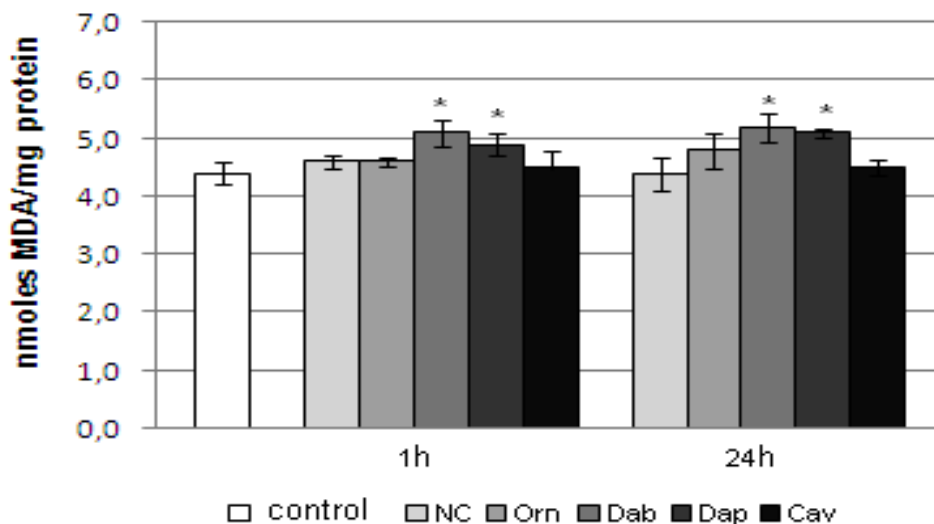
Наблюдава се понижение на концентрацията на MDA в пробите, в присъствие на високи концентрации (100 μM) на N/OFQ(1-13)NH₂, [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ т.е те показват известен протективен ефект за разлика от резултатите *in vitro* в мозък. Единствено [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ потиска LP дори при 1 μM (Фиг. 8A). Не бяха отчетени промени в нивата на GSH (Фиг. 8B).

Благоприятните тенденции при N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹] N/OFQ(1-13)NH₂ се наблюдават само при високите концентрации на пептидите. Очевидно е, че при физиологични условия ноцицептинът не би повлиял свободнорадикалните процеси в организма. Той би могъл да има значение само при патофизиологични състояния, при които концентрацията му е значително повишена: чернодробни заболявания, сепсис, артрит и др.

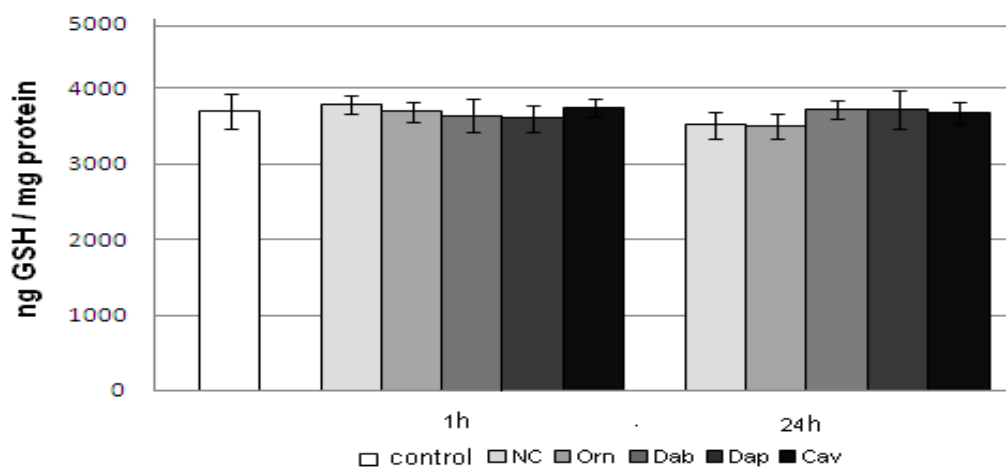
Активностите на антиоксидантните ензими при тези експерименти останаха непроменени (данните не са показани)

4.4. *In vivo* ефекти на ноцицептина и неговите структурни аналози върху антиоксидантния статус в мозък на плъх

Въведени в мозък, както на 1, така и на 24 час след прилагането им аналозите [Dab⁹] N/OFQ(1-13)NH₂ и [Dap⁹] N/OFQ(1-13)NH₂ водят до завишени нива на LP(Фиг.9), което се дължи вероятно на тяхната цитотоксичност. Промени в нивата на GSH не се наблюдаваха (Фиг. 10).

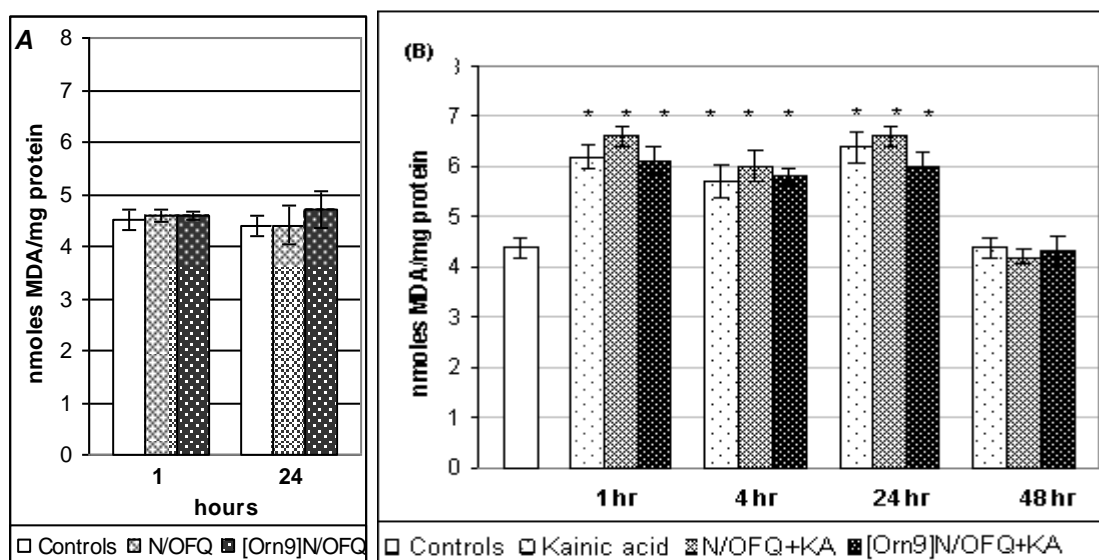


Фигура 9. *In vivo* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите структурни аналози [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ въведени самостоятелно върху MDA статус в мозък от плъх.



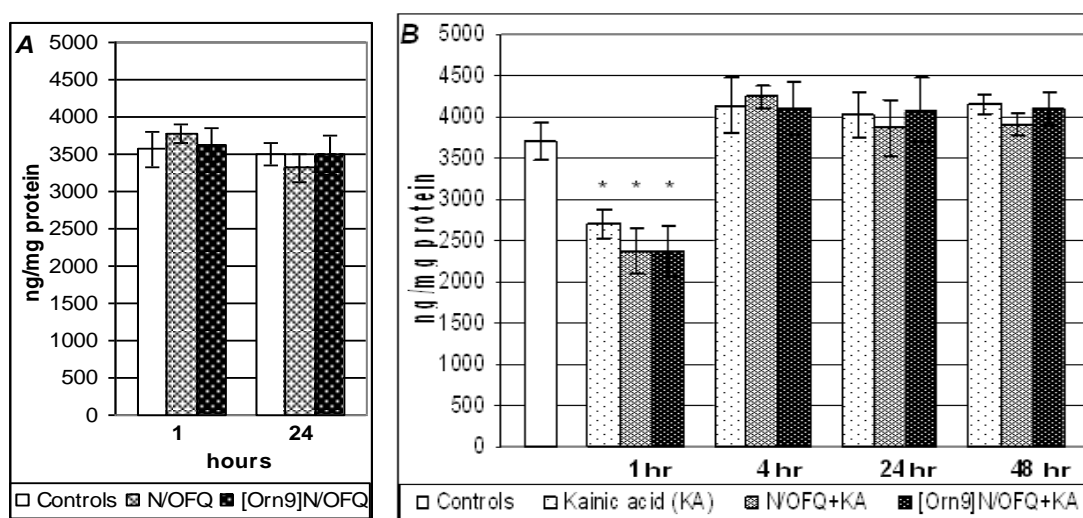
Фигура 10. *In vivo* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите структурни аналози [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ въведени самостоятелно върху нивата на GSH в мозък от плъх.

In vivo ефектите на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ бяха изследвани също така през различни интервали от време (на 1 ч., 4 ч., 24ч. и 48 ч.) след въвеждане i.c.v. на КА в мозъка, тъй като промени в антиоксидантните защитни системи настъпват в различни времеви интервали след третирането.



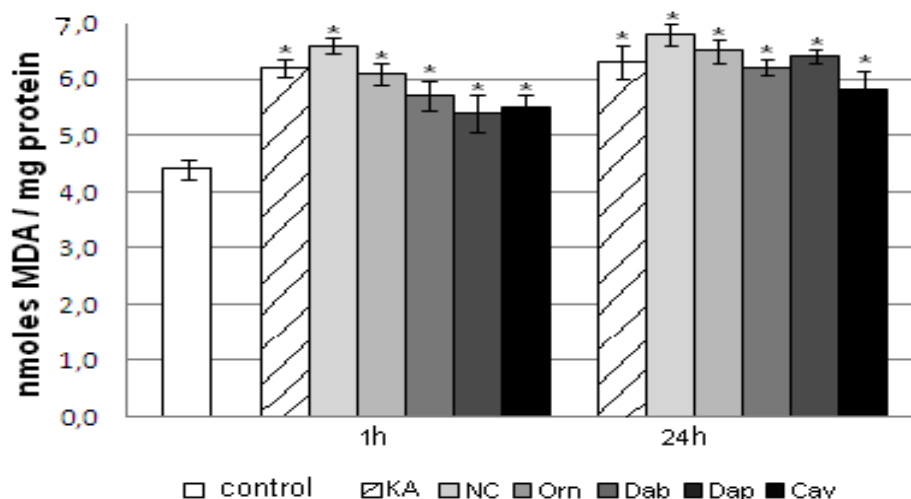
Фигура 11. *In vivo* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху нива на липидна пероксидация (A) без КА (B) с КА в мозък на 1, 4, 24 и 48 час след третиране.

В сравнение с контролата, въвеждането на КА увеличава концентрацията на MDA измерена на 4 и на 24 час в пробите (Фиг.11) с най-значителни промени на 24 час и намалява нивата на GSH 1 час (Фиг.12) след третиране. Получените резултати предопределиха интервалите, на които да бъде изследвано действието на останалите пептиди върху антиоксидантния статус на мозък, а именно на 1 и 24 час след третиране с КА.

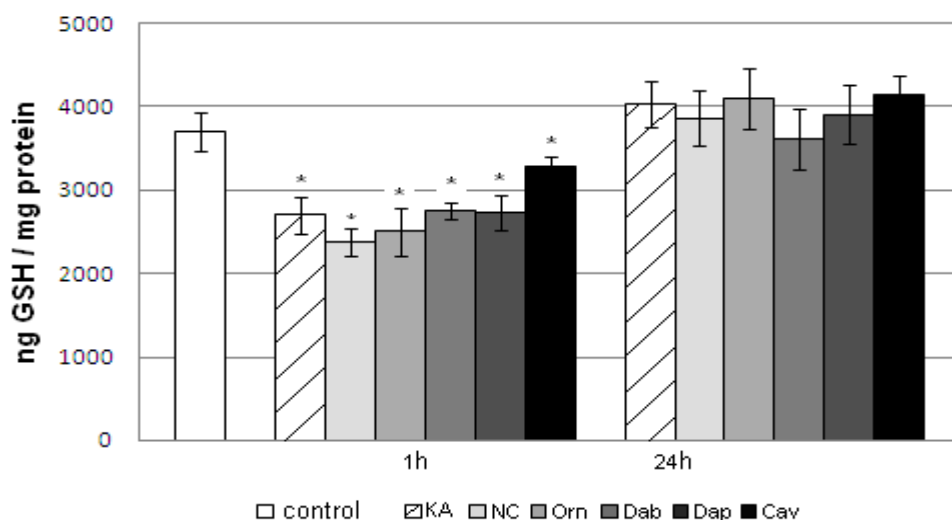


Фигура 12. *In vivo* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху нива на GSH (A) без КА (B) с КА в мозък на 1, 4, 24 и 48 час след третиране.

Прилагането на изследваните пептиди не намалява КА-индуцираното прекисно окисление. Тези резултати са подобни на регистрираните и при *in vitro* експериментите. Обаче спрямо групата, третирана само с КА, структурните аналози [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ слабо намаляваха LP (Фиг.13) един час след въвеждане на КА, а двадесет и четири часа след въвеждане на КА само при [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ се запазва тази тенденция.



Фигура. 13. *In vivo* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите структурни аналози [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ въведени 30 мин. след КА върху MDA статус в мозък от плъх



Фигура 14. *In vivo* ефекти на N/OFQ (1-13)NH₂ и неговите структурни аналози [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ въведени 30 мин. след КА върху нивата на GSH в мозък от плъх

Въвеждането на КА в мозък на плъх води до значително намаляване на нивото на глутатиона след 1 час, което не се компенсира от ноцицептина и неговите аналози. Единствено [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ повишава КА-индуцирана редукция на нивата на GSH, без обаче да достигне контролните нива (Фиг.14). 24 часа след третиране на животните нивата на глутатиона са възстановени и не се влияят от невропептидите.

По отношение на антиоксидантните ензими нито третирането с КА, нито с невропептидите, както и комбинирането им не показва влияние върху активността на ензимите (Таблица 1), с изключение на [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, който, приложен самостоятелно на 1 час активира SOD, но в присъствие на КА няма ефект.

Таблица 1. *In vivo* ефекти на N/OFQ(1–13)NH₂, [Orn⁹]N/OFQ(1–13)NH₂, [Dab⁹]N/OFQ(1–13)NH₂, [Dap⁹]N/OFQ(1–13)NH₂ и [Cav⁹]N/OFQ(1–13)NH₂ върху ензимната активност в мозък на плъх при контролни и третирани с КА животни на 1-ви, 4-и, 24-и и 48-ми час след въвеждането.

Глутатион пероксидаза				
<i>Контролни животни</i>				
Експериментални групи	1 час след въвеждане	4 часа след въвеждане	24 часа след въвеждане	48 часа след въвеждане
Без пептиди	29.9±1.78	29,7 ± 2,23	31,1 ± 2,57	28,6 ± 1,14
N/OFQ(1–13)NH ₂	29.6±1.28		30.2±3.01	
[Orn ⁹] N/OFQ(1–13)NH ₂	30.3±1.42		27.1±2.42	
[Dab ⁹]N/OFQ(1–13)NH ₂	31.5±3.11		32.9±1.74	
[Dap ⁹]N/OFQ(1–13)NH ₂	27.0±2.70		30.4±2.32	
[Cav ⁹]N/OFQ(1–13)NH ₂	30.2±2.89		31.7±0.83	
<i>КА-третирани животни</i>				
Без пептиди	30.8±0.85	31,8 ± 3,00	27,4 ± 1,81	27,2 ± 1,40
N/OFQ(1–13)NH ₂	29.4±0.72	31,2 ± 4,15	28.7±1.63	29,8±1,19
[Orn ⁹] N/OFQ(1–13)NH ₂	28.3±0.95	33,6 ± 4,83	27.1±1.59	29,0 ± 1,31

[Dab ⁰]N/OFQ(1-13)NH ₂	3.9±0.20		33.6±0.22	
[Dap ⁰]N/OFQ(1-13)NH ₂	30.9±0.18		33.9±0.22	
[Cav ⁰]N/OFQ(1-13)NH ₂	27.3±2.36		32.5±0.81	
Супероксид дисмутаза				
<i>Контролни животни</i>				
Без пептиди	18,5±1,14	19,2 ± 2,13	17,8 ± 1,99	16,9± 0,81
N/OFQ(1-13)NH ₂	20.9±1.16		19.3±1.27	
[Orn ⁰] N/OFQ(1-13)NH ₂	20.9±1.10		17.1±1.67	
[Dab ⁰]N/OFQ(1-13)NH ₂	23.0±1.45		22.3±1.66	
[Dap ⁰]N/OFQ(1-13)NH ₂	19.3±0.39		20.4±1.88	
[Cav ⁰]N/OFQ(1-13)NH ₂	29.9±2.54*		17.1±1.85	
<i>КА-третирани животни</i>				
Без пептиди	20.7±1.35	19,2±0,47	19.1±1.25	18,1±0,86
N/OFQ(1-13)NH ₂	21.1±1.19	17,2±1,20	19.4±1.05	18,1±0,97
[Orn ⁰] N/OFQ(1-13)NH ₂	21.8±2.28	15,6±0,99	17.3±1.24	17,2±0,46
[Dab ⁰]N/OFQ(1-13)NH ₂	19.5±1.10		18.8±2.77	
[Dap ⁰]N/OFQ(1-13)NH ₂	18.9±0.46		18.1±0.23	
[Cav ⁰]N/OFQ(1-13)NH ₂	17.5±1.01		17.1±1.65	
Глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа				
<i>Контролни животни</i>				
Без пептиди	21.5±1.65	22,4±1,47	20,7 ± 1,58	21,6±1,29
N/OFQ(1-13)NH ₂	22.4±0.64		21.2±1.25	
[Orn ⁰] N/OFQ(1-13)NH ₂	23.1±0.92		21.4±1.14	

[Dab ⁹]N/OFQ(1-13)NH ₂	22.6±1.05		21.1±1.73	
[Dap ⁹]N/OFQ(1-13)NH ₂	21.4±0.58		22.4±1.06	
[Cav ⁹]N/OFQ(1-13)NH ₂	22.5±0.66		23.4±0.39	
<i>КА-третиранни животни</i>				
Без пептиди	21.5±1.65	22,4±1,85	23.3±1.48	22,7±0,67
N/OFQ(1-13)NH ₂	23.5±2.18	21,6±0,96	22.7±1.07	23,4±1,19
[Orn ⁹] N/OFQ(1-13)NH ₂	24.6±1.49	22,5±1,64	22.9±0.64	22,2± 1,12
[Dab ⁹]N/OFQ(1-13)NH ₂	21.6±0.46		24.4±2.46	
[Dap ⁹]N/OFQ(1-13)NH ₂	20.8±1.83		22.0±1.22	
[Cav ⁹]N/OFQ(1-13)NH ₂	23.8±1.15		25.4±1.88	

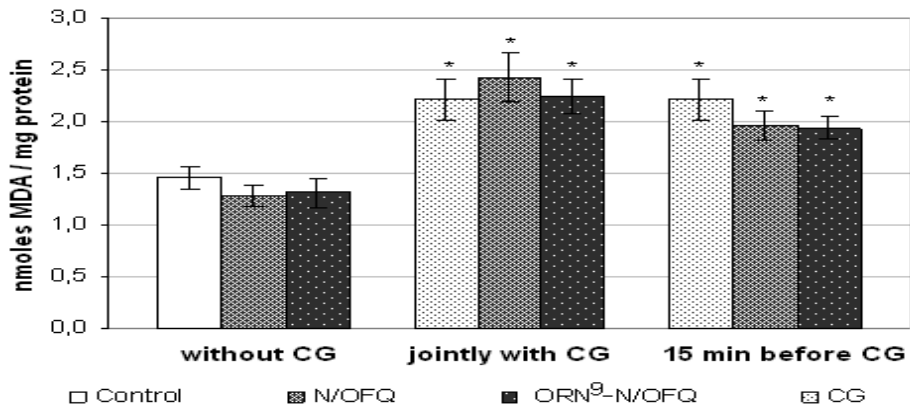
Представените резултати са ± SEM на 4-7 животни.

Активността на ензимите е изразена за GRx като nmoles NADP(H)/min/mg protein; за SOD като U/mg protein и за Glu-6-P-DH като nmoles NADP(H)/min/mg protein.

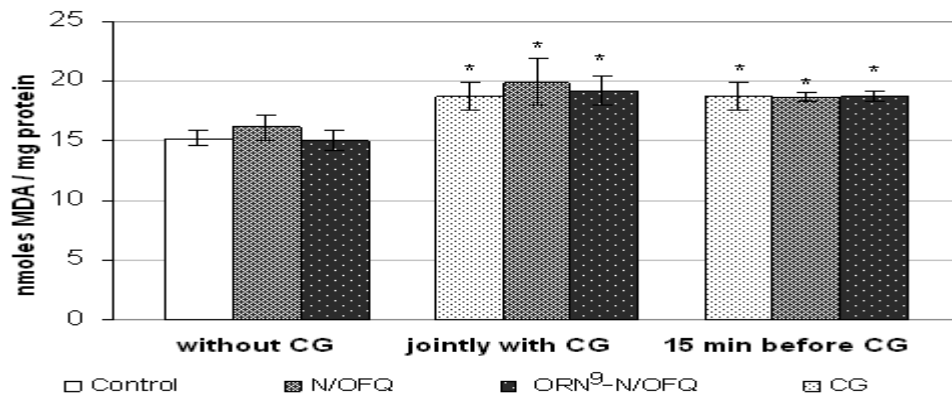
4.5. *In vivo* ефекти на ноцицептина и неговите структурни аналози върху антиоксидантния статус в черен дробна плъх

4 часа след инжектиране на лапата на плъха с CG в черния дроб се наблюдаваше увеличение на спонтанната и Fe³⁺/аскорбат индуцираната LP (Фиг.15 и Фиг.16), както и намаление на нивата на GSH (Фиг. 17). Тези резултати са в съгласие с Dhuley et al. (1993) и Lu et al. (2007), които показват, че CG-индуцираното възпаление в лапа повишава LP в черен дроб. Нито N/OFQ(1-13)NH₂, нито [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ повлияват изследваните параметри при контролните и при третираните с карагелан животни. Единствено се наблюдава тенденция за увеличение на нивата на GSH след прилагането на орнитиновия аналог при третираните с CG животни, но без да достигнат контролните нива (Фиг. 17).

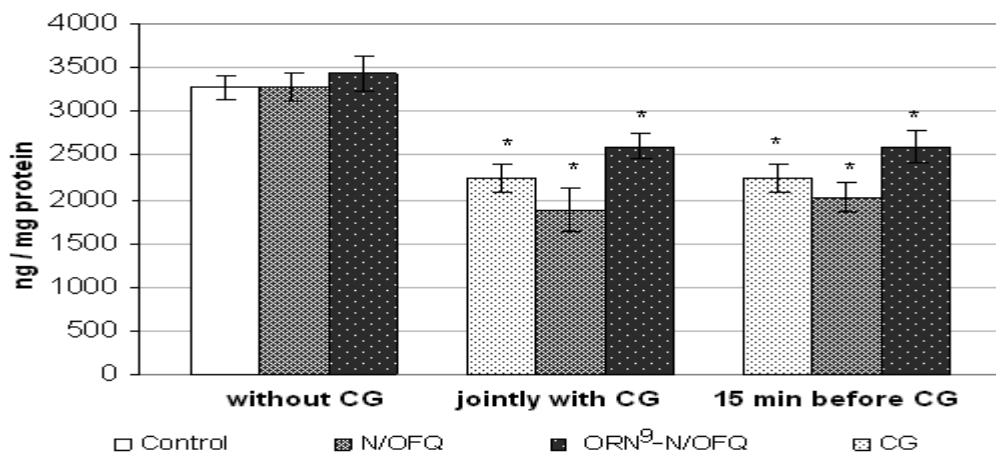
Активността на антиоксидантните ензими остана непроменена и при контролните и при третираните с CG животни (данните не са представени).



Фигура 15. *In vivo* ефект на N/OFQ и [Orn⁹]N/OFQ върху спонтанна липидна пероксидация в черен дроб.



Фигура 16. *In vivo* ефект на N/OFQ и [Orn⁹]N/OFQ върху Fe³⁺/аскорбат-индуцирана липидна пероксидация в черен дроб.

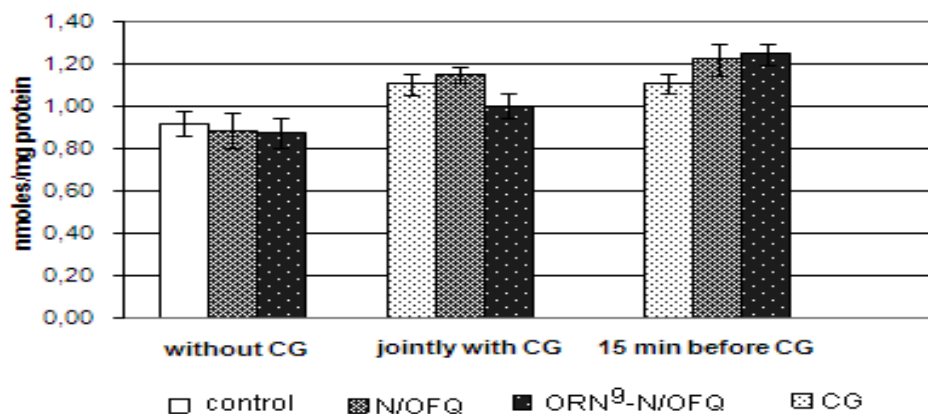


Фигура 17. *In vivo* ефект на N/OFQ и [Orn⁹]N/OFQ върху нива на глутатион в черен дроб.

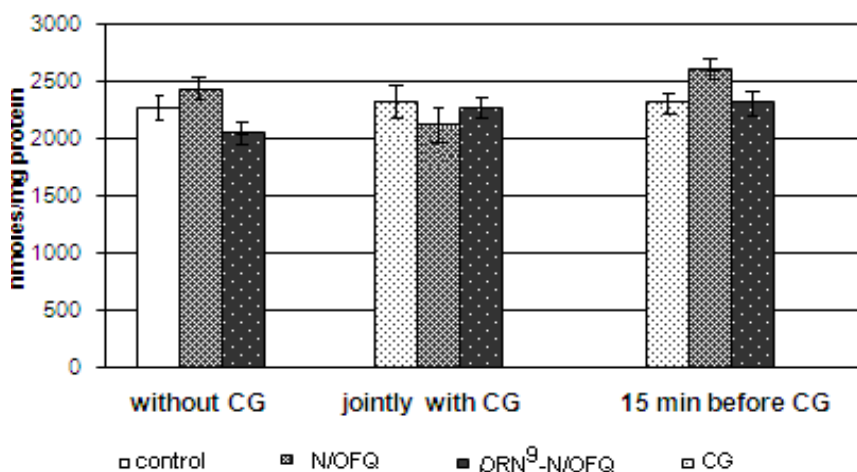
4.6. *In vivo* ефекти на ноцицептина и неговите структурни аналози върху антиоксидантния статус в кръв от плъх

Тъй като N/OFQ(1-13)NH₂ играе роля в кардиоваскуларната регулация, mRNA на прекурсора на ноцицептина, препроноцицептин, се експресира в аортата, белодробната артерия, бъбречната артерия и вените във високи нива, сравними с тези в мозъка. Поради тази причина ние проведохме изследвания за влиянието на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху еритроцитния антиоксидантен статус след индуциране на възпалителен процес.

При възпаление на лапа, предизвикано от инжектиране на CG, 4 часа след третирането беше установено увеличение на нивата на LP в еритроцити (Фиг. 18).



Фигура 18. *In vivo* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху нива на LP в еритроцити при контроли и третиран с CG плъхове.



Фигура 19. *In vivo* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹] N/ OFQ(1-13)NH₂ върху нива на GSH в еритроцити при контроли и третиран с CG плъхове.

При едновременното прилагане на изследваните пептиди с CG, както и при въвеждането им 15 мин преди него, на 4 час след инжектирането на лапата се повишаваха нивата на MDA, но не бяха отчетени промени в нивата на GSH (Фиг. 18 и 19). При същата експериментална постановка не бяха отчетени и промени в активността на антиоксидантните ензими (данните не са показани).

В допълнение бяха измерени и кръвните показатели хемоглобин и хематокрит, при които не беше отчетена промяна в пробите от карагенан-третираните животни в сравнение с контролните животни (Таблица 2).

Таблица 2. *In vivo* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1 - 13)NH₂ върху нивата на хемоглобин и хематокрит след CG индуцирано възпаление в тъкан от лапа на плъх.

	Хемоглобин	Хематокрит
	<i>Контролни животни</i>	
Нетретирани	13.9±0.58	51.3±2.23
N/OFQ(1-13)NH ₂	13.7±0.83	51.0±2.26
[Orn ⁹]N/OFQ(1-13)NH ₂	14.4±0.72	49.7±1.17
	<i>Третирани животни</i>	
Карагенан (CG)	15.0±0.44	52.4±1.89
Карагенан+пептид, приложен едновременно с CG:		
- N/OFQ(1-13)NH ₂	14.0±0.76	48.5±1.89
- [Orn ⁹]N/OFQ(1-13)NH ₂	14.7±0.73	51.8±2.22
Карагенан+пептид, приложен 15 min преди CG:		
- N/OFQ(1-13)NH ₂	13.7±0.28	47.0±2.51
- [Orn ⁹]N/OFQ(1-13)NH ₂	13.9±0.27	49.6±0.38

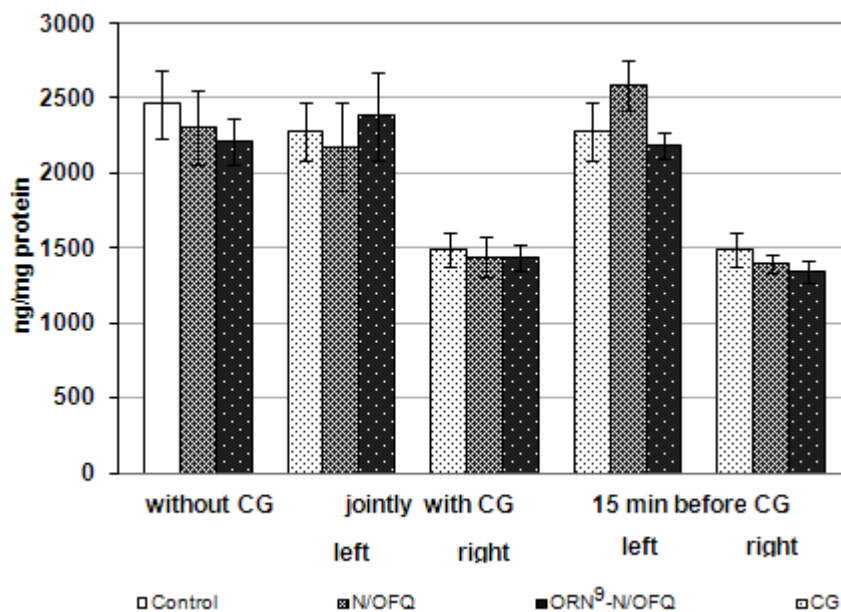
Представените резултати са ± SEM на 9 животни;
Хемоглобинът е изразен като гр/100 мл кръв, хематокритът е изразен в %.

4.7. *In vivo* ефекти на ноцицептина и неговите структурни аналози върху антиоксидантния статус в тъкан от лапа на плъх.

Стойностите на всички изследвани параметри, измерени в тъкан от лява лапа на CG третирани животни бяха подобни на тези, измерени в тъкан от лапа на нетретирани с CG животни. Затова приехме за контроли измерените параметри в лява (нетретирана) лапа на плъх.

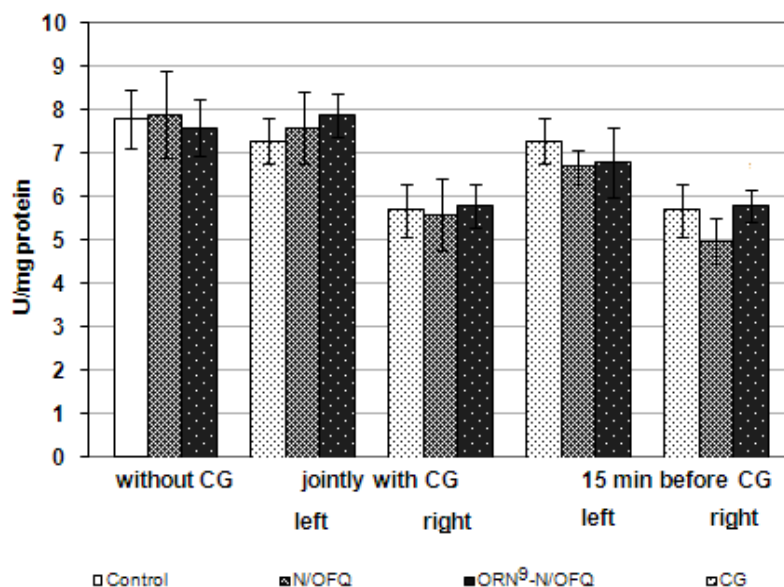
Инжектирането на CG доведе до намаляване на нивата на GSH в тъкан от дясна лапа (възпалена) в сравнение с лява (невъзпалена) лапа (Фиг. 20).

Пептидите, приложени самостоятелно не повлияха нивата на GSH. N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ приложени с CG, независимо от времето на въвеждането им, не промениха CG-индуцираното намаление на GSH (Фиг. 20).



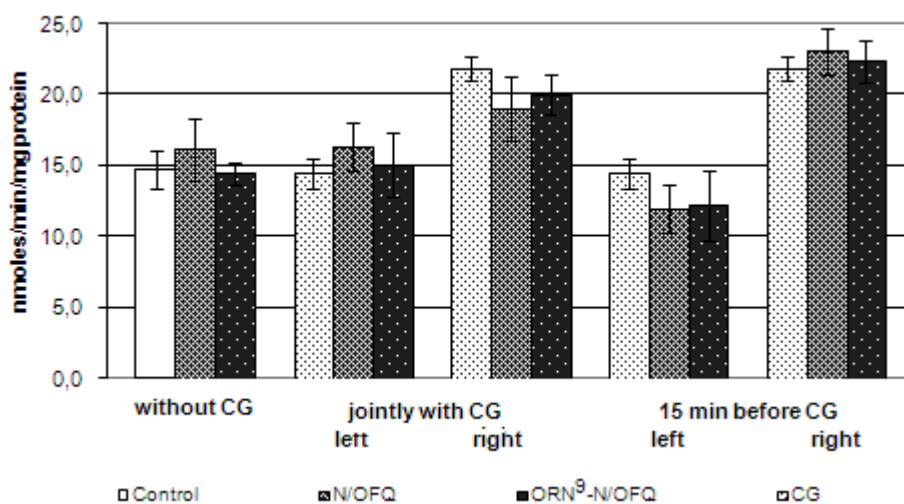
Фигура 20. *In vivo* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху нива на GSH в тъкан от лапа на плъх.

Намаление на активността на SOD се наблюдава в дясна лапа след инжектиране на карагенан, а в лява активността на SOD остава непроменена (Фиг. 21). Третирането с пептидите не променя този ефект.



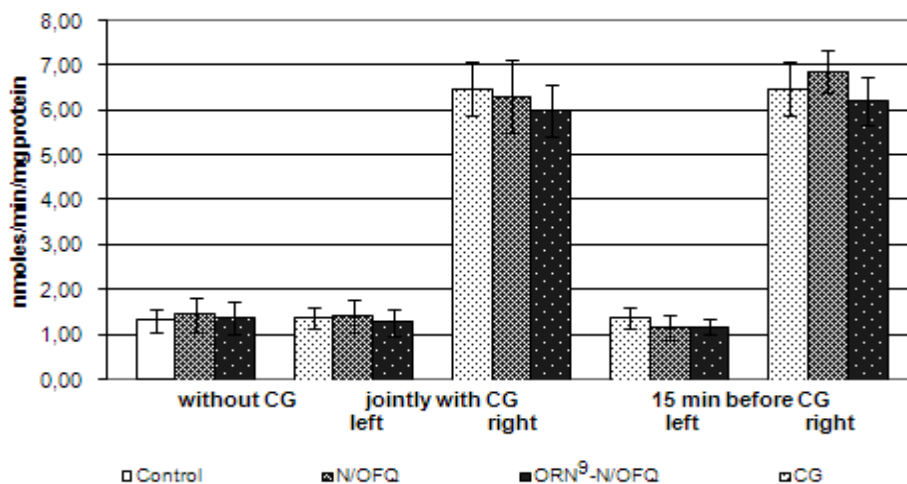
Фигура 21. *In vivo* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху SOD активност в тъкан от лапа на плъх.

След инжектиране на карагенан, активността на GSH-Px беше завишена в дясна лапа, като N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, въведени заедно с CG леко понижаваха (статистически незначимо) CG-индуцираната увеличена активност на GSH-Px в тъканта на възпалената лапа (Фиг. 22).



Фигура 22. *In vivo* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху GSH-Px активност в тъкан от лапа на плъх.

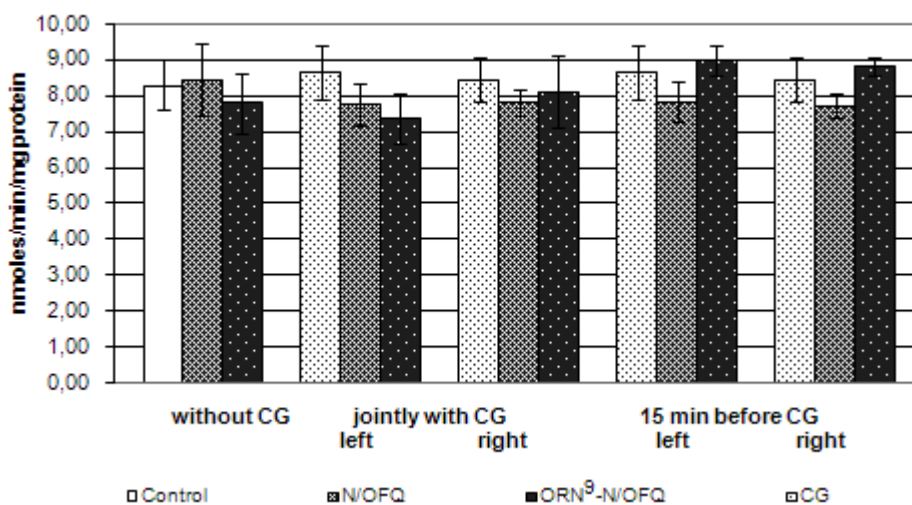
При Glu-6-P-DH, който е от значение за антиоксидантната активност на GSH-свързаните ензими, се наблюдава значително увеличена активност в третираната с карагенан дясна лапа. И тук N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ не оказваха влияние върху карагенан-индуцираните промени (Фиг. 23).



Фигура 23. *In vivo* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху Glu-6-P-DH активност в тъкан от лапа на плъх.

По-високата активност на този ензим би могла да се обясни с увеличението на концентрацията на неговия субстрат (NADP^+) като резултат от CG-предизвиканата индукция на NAD(P)H оксидаза ($\text{NADPH} + \text{e}^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{O}_2^- + \text{H}^+$).

По отношение на активността на GSSG-Red не бяха регистрирани промени като в резултат от инжектиране на карагенан, така и при въвеждане на пептидите самостоятелни или при третиране с комбинацията от карагенан и пептид (Фиг. 24).



Фигура 24. *In vivo* ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху GSSG-Red активност в тъкан от лапа на плъх.

В заключение нито N/OFQ(1-13)NH₂, нито [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ модифицираха CG-предизвиканите промени в антиоксидантния статус независимо от времето им на въвеждане (едновременно или 15 мин преди CG).

5. Обсъждане

Клинични изследвания показват, че плазмената концентрация на N/OFQ при пациенти със сепсис след хирургическа намеса е много по-висока при тези с летален изход (3,0пг/мл), отколкото при преживелите - 1,0мг/мл (Williams et al., 2008). Fiset et al. (2003) отчитат също наличие на ноцицептин в синовиалната течност от пациенти, страдащи от артрит, най-вероятно освободен при деградацията на неутрофилите. Интерес предизвиква установеното повишаване на нивото на ноцицептин в астроцити, регулирано от медиаторите на възпалението (Buzas et al., 2002). Завишени нива на N/OFQ са наблюдавани и при пациенти с

хепатоцелуларен карцином (Szalay et al., 2004). Всичко това предполага участие на ноцицептина във възпалителните отговори при някои невропатологични условия. Като имахме предвид, че възпалението е процес, съпътстван и от оксидативен стрес, възниква въпросът дали N/OFQ може да промени нивата на клетъчните антиоксиданти в нормални и патологични условия. Тези знания са от важно теоретично и практическо значение. До момента такива данни за него не са публикувани. Освен това, антиоксидантната активност е важна характеристика и за структурните му аналози, синтезирани чрез модифициране на последователността във веригата през последните няколко години.

При нормални условия образуваните ROS се неутрализират от клетъчните антиоксидантни защитни системи. При патологични условия балансът оксидант/антиоксидант се променя. Добре известно е, че увеличената АФК-продукция и оксидативният стрес могат да доведат до увреждане на клетката. Нарушаването на този баланс обикновено е свързано с промени в активността и нивата на ендогенните клетъчни антиоксидантни системи, съответно ензимни и неензимни, както и промени главно в нивата на LP.

В настоящата работа ефектите на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите новосинтезирани аналози [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ бяха изследвани върху различни оксидантни индекси: нива на LP и GSH и активност на ензимите SOD, CAT, GPx, GRed и свързаната с тях G-6-P-DH в различни органи: мозък, черен дроб, кръв и тъкан от лапа. За установяване на про/антиоксидантните свойства на ноцицептина и неговите аналози в настоящата работа бяха използвани различни методи и модели.

КА-моделът беше избран, тъй като КА индуцира оксидативен стрес. Установено е, че въвеждането на КА води до увеличаване на концентрацията на азотен окис (Sumanont et al., 2006) и на супероксидни радикали (Liang et al., 2000). *In vivo* КА води до увеличаване на липидната пероксидация, намаляване нивото на GSH и активността на ензима GSH-Px (Sok et al., 2006); увеличена липидна пероксидация е установена и в *in vitro* експерименти с КА (Bose et al., 1992; Puttfarcken et al., 1993; Yamamoto and Mohanan, 2003).

КА-индуцираната смърт на мозъчните неврони може да бъде предотвратена или чрез инхибиране на ензима ксантин оксидаза (източник на супероксидни аниони в клетката) или чрез добавяне на ловители на свободни радикали (Dykens

et al., 1987; Candelario-Jalil and Leon, 2003). Протекцията срещу КА-индуцираната ексцитотоксичност може да се осъществи още и чрез блокиране на СОХ/липооксигеназните пътища посредством въвеждането на антиоксиданти (Kim et al., 2000). Корелацията между КА-индуцираното генериране на свободни радикали и предизвиканата от нея токсичност е разглеждана и от други изследователски групи (Sun et al., 1992; Bose et al., 1992; Puttfarcken et al., 1993).

С помощта на този модел в опити *in vivo* и *in vitro* са изследвани протективните антиоксидантни ефекти на редица субстанции, като мелатонин (Uz et al., 1996; Mohanan and Yamamoto, 2002; Yamamoto and Mohanan, 2003), фенидон (Kim et al., 2000); нимезулид (Candelario-Jalil and Leon, 2003); L-NAME и NG-нитро-L-аргинин (Tutka et al., 1996) и много други.

Нашите резултати, както *in vitro* (изследвано в хомогенати от мозък и черен дроб на плъх), така и *in vivo* (мозък, черен дроб, кръв и тъкан от лапа на плъх) показва идентични ефекти на N/OFQ и неговият структурен аналог [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху антиоксидантната активност – те не я повлияват. Това се обяснява с факта, че Orn, който е структурен аналог на Lys, съдържа в страничната си верига една CH₂ група по-малко, т.е. между двата пептида няма съществена структурна разлика (Naydenova et al., 2006). Допълнителното скъсяване на дължината на страничната верига (в случая на [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂) с по още една - CH₂ - група довежда до проява на прооксидантна активност от тези съединения. Тези ефекти на [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ вероятно са свързани с по-ниската им активност като ловители на свободни радикали, наблюдавана в ROS- генериращи химични системи. Изводът се потвърждава и от предизвиканата от тези съединения при опити *in vitro* повишена LP и намален GSH в мозъчен хомогенат. От получените данни можем да обобщим, че скъсяването на страничната верига в позиция 9 на N/OFQ води до поява на прооксидантен ефект от тези аналози и те биха могли да предизвикат увреждане на клетката. Причина за такъв ефект е възможно да бъде и намаляване на ROS “scavenger” активността им.

Както вече споменахме, понижаването на вътреклетъчните нива на GSH (ключов компонент при вътреклетъчната защита срещу ROS – индуцирано увреждане) имат важна роля при КА-индуцирана невротоксичност (Сессон et al, 2000). В опитите *in vivo*, от тестваните аналози единствено канаваниновият показва защитен ефект срещу КА-индуцираните промени в нивата на GSH в мозък.

Неговият антиоксидантен капацитет в ROS-генериращи химически системи също беше по-висок в сравнение с останалите аналози – той се проявява още при концентрация 10 μ M.

Нашите резултати се потвърждават и от литературни данни, че канаванинът намалява окислителните процеси в мозък в ранни фази на ендотоксичен шок, характеризиращ се с намалено съдържание на GSH и увеличени LP, Glu-Px активност и нива на лактат в кръвта (Abd El-Gawad et al., 2001). Може да се предположи, че канаванинът е определящ за ефекта на аналога, в който е включен, което се наблюдава в настоящето изследване. Активностите на изследваните антиоксидантни ензими GSH-Px, SOD, Glu-6-P-DH останаха непроменени.

Включването на различни аминокиселини в молекулата на ноцицептина (в случая заместване на Lys с други аминокиселини) може да бъде от значение и да доведе до промени в неговите ефекти като вероятно в нашите системи гуанидиновата група реагира предимно с H₂O₂ и така предпазва от възможността за генериране на HO[•] радикали.

Според някои автори е възможно да има разлика в имунните отговори към N/OFQ, когато е въведен в периферната и в ЦНС (Serano-Gomez et al., 2011). Това ни даде нова насока за изследване: да проследим действието на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговия структурен аналог [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ *in vivo* и при карагенанов модел на възпаление.

В експерименталната практика мукополизахаридът карагенан (CG) често се използва за индуциране на остро периферно възпаление в лапа. CG води до активация на NAD(P)H оксидазите, iNOS експресия, ускоряване на метаболизма на арахидоновата киселина и простагландин E₂(PGE₂) и нивата на церулоплазмина, натрупване на желязо и намаляване на нивата на глутатиона (Lu et al, 2007; Rossi et al., 2003). Важен фактор при отговора след карагенан – индуцираното възпаление е азотния оксид (NO). (Salvemini et al, 1996). Увеличаването на NO, COX активността и производните на кислорода свободни радикали могат да причинят липидна пероксидация и увреждане на клетката (Cuzzocrea et al., 1997, 1998; Salvemini et al., 1995). Супероксидният и пероксинитритният (NOOO[•]) радикали играят критична роля в развитието на противовъзпалителния отговор (Khattab, 2006).

Опиоидните пептиди потискат неврогенното възпаление, което се дължи на тяхната способност да инхибират освобождаването на трансмитери от капсаicin-чувствителните първични аферентни нервни терминали (Maggi, 1991; Brock et al., 2008; Ascari et al., 2008; Halyes et al., 1997). Възпалението е придружено и с повишена продукция на активни форми на кислорода, но ние не открихме данни за про- или антиоксидантна активност на N/OFQ при тези условия.

Всички тези характеристики на карагенан-индуцираното възпаление го правят подходящ модел за тестване на антиоксидантния капацитет на различни субстанции.

От описаните резултати се вижда, че при този модел на възпаление нито N/OFQ(1-13)NH₂ нито [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ проявяват про- или антиоксидантна активност, независимо от изследваната тъкан – от лапа, черен дроб или кръв.

В успоредни с нашите експерименти, в *in vivo* изследвания проведени в лаборатория „Медиаторни механизми на лекарствените ефекти“ към „Институт по невробиология“ беше установено, че N/OFQ(1-13)NH₂, инжектиран едновременно с CG, редуцира възпалението на лапата. В края на опита (4 часа след инжектирането с CG) от животните беше отделяна тъкан от лапа, черен дроб и кръв, в които бяха изследвани маркерите на оксидативен стрес. Нашите резултати показаха, че нито N/OFQ(1-13)NH₂ нито [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ повлияват антиоксидантните показатели.

Съпоставянето на резултатите ни доведе до заключението, че антиинфламаторният ефект на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ при модел на CG-предизвикано остро периферно възпаление се дължи най-вероятно на потискане на неврогенния компонент на възпалението. Подобни данни, според които N/OFQ не повлиява не-неврогенното възпаление са публикувани и от Helyes et al., 1997. Допуснатата от нас възможност за повлияване на възпалителния процес чрез антиоксидантно действие на N/OFQ(1-13)NH₂ като допълнителен механизъм, не се потвърди.

Като обобщение можем да кажем, че независимо от времето на въвеждане (едновременно или 15 мин. преди карагенана) нито един от двата пептида не модифицира CG-индуцираните промени в антиоксидантния статус. От всички тези данни може да се каже, че нито N/OFQ(1-13)NH₂ нито неговият структурен аналог [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ действат по свободно-радикален механизъм.

6. Изводи

1. В химични системи, генериращи свободни радикали, всички изследвани пептиди проявяват антиоксидантни свойства само във високи концентрации ($>100\mu\text{M}$), като Cav-аналог показва най-висока ефективност (70%) при неутрализиране на .OH радикали. Единствено Cav-аналог в концентрация $10\mu\text{M}$ инхибира O_2^- -зависимата NBT редукция.

2. Изследваните пептиди, приложени *in vitro* в мозъчен хомогенат, не променят клетъчния оксидантен статус, с изключение на Dab и Dar-аналозите, които във високи концентрации, достоверно повишават нивата на LP и понижават нивата на GSH.

3. При *in vitro* прилагане, никои от невропептидите не намалява КА-индуцираните промени в мозъчен хомогенат.

4. В опити *in vitro*, инкубирането на изследваните пептиди ($100\mu\text{M}$) в чернодробен хомогенат, с изключение на Dab- и Dar-аналозите, води до понижаване на нивата на LP. Единствено Cav-аналог намалява нивото на TBARs в ниска концентрация ($1\mu\text{M}$).

5. I.c.v въвеждането в мозък на Dab и Dar-аналозите води до повишаване на нивата на LP. При въвеждането на КА 30 мин след въвеждане на ноцицептиновите аналози се наблюдава тенденция за намаляване на нивата на LP, а третирането с Cav-аналог води до увеличение на нивата на GSH на 1ч., но измерените стойности не достигнат контролните нива.

В заключение може да се каже, че промяната в структурата на ноцицептина може да доведе до промяна в антиоксидантните му свойства. Скъсяването на веригата (при Dar и Dab-аналозите) води до проява на прооксидантни свойства. Cav-аналог, в сравнение с другите пептиди, променя клетъчния оксидантен статус, което се дължи най-вероятно на антиоксидантните свойства на самия канаванин.

7. Справка за приносите на дисертационния труд

1. За първи път е изследван про/антиоксидантният потенциал на ноцицептина при нормални и патологични условия, съпътствани от повишена продукция на АФК (в химически системи, в условия *in vitro* и *in vivo* след третиране на животните с каинова киселина или карагенан). Установено е, че ноцицептинът не променя антиоксидантния статус нито при нормално, нито при повишено генериране на АФК в клетките.

2. За първи път е изследван про/антиоксидантният потенциал на ноцицептиновите аналози [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ при нормални и патологични условия, съпътствани от повишена продукция на АФК (в химически системи, в условия *in vitro* и *in vivo* след третиране на животните с каинова киселина или карагенан). Установено е, че скъсяването на страничната верига в позиция 9 на ноцицептина с две или три -CH₂- групи - [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Dap⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ води до поява на прооксидантни свойства от новосинтезираните съединения *in vitro* и *in vivo* в мозък.

3. [Cav⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ демонстрира добра антиоксидантна активност, която най-вероятно се дължи на наличието на гуанидиновата група в молекулата на канаванина. Получените оригинални данни потвърждават, че въвеждането само на една различна аминокиселина може да промени антиоксидантните свойства на цялата пептидна молекула.

4. Доказано е, че ноцицептинът не осъществява противовъзпалителните си ефекти посредством свободно-радикален механизъм.

8. Приложения

8.1. Публикации във връзка с дисертационния труд

1. **Tzvetanova E.**, Pavlova A., Alexandrova A., Nenкова G., Petrov L., Kirkova M. and Girchev R. (2009) Are Nociceptin(1-13)NH₂ and its structural analogue [ORN⁹]Nociceptin(1-13)NH₂ able to affect brain antioxidant status in control and kainic acid-treated rats? Cell Biochemistry and Function; 27(4):243-50; IF 1.515

2. Zamfirova R., **Tzvetanova E.**, Alexandrova A., Petrov L., Mateeva P., Pavlova E., Kirkova M., Todorov S. (2009) In-vivo effects of nociceptin on carragenan-induced inflammation: rat-paw oedema and antioxidant status. Central European Journal of Biology; 4(2):170-178; IF 0.915

3. Petrov L., **Tzvetanova E.**, Pavlova A., Alexandrova A., Zamfirova R., Kirkova M., Todorov S. (2010) In-vivo effects of nociceptin and its structural analogue [Orn⁹]nociceptin on the antioxidant status of rat blood and liver at carragenan-induced paw inflammation. Central European Journal of Medicine 5(11):123-131. IF 0.244

4. **Tzvetanova E.**, Nenкова G., Georgieva A., Alexandrova A., Girchev R., Kirkova M. (2011) Effects of structural analogues of nociceptin (1-13)NH₂ on brain antioxidant status in kainic acid-treated rats. Cell Biochemistry and Function; 29:135-141; IF 1.651

8.2. Научни съобщения по темата на дисертационния труд

1. **Tzvetanova E.**, Pavlova A., Petrov L., Nenкова G., Ivanova D., Kirkova M. and Gurchev R. Effects of nociceptin and its structural analogue [Ornitin⁹]Nociceptin on markers of oxidative stress in brain of control and kainic acid-treated rats. Петия Български Пептиден симпозиум 28-30 Май 2008 г. Бачиново, р. 5

2. Mateeva P., Petrov L., **Tzvetanova E.**, Pavlova A., Kirkova M. and Zamfirova R. Effects of nociceptin and [Orn⁹]Nociceptin on carrageenan-induced inflammation in rat paw oedema. Петия Български Пептиден симпозиум 28-30 Май 2008 г. Бачиново, р.60

3. Petrov L., **Tzvetanova E.**, Pavlova A., Mateeva P., Kirkova M. and Zamfirova R. Effects of nociceptin and its structural analogue [Orn⁹]Nociceptin on markers of oxidative stress in blood and liver of rats with acute carrageenan-induced paw oedema. Петия Български Пептиден симпозиум, 28-30 Май 2008 г. Бачиново, р. 38

4. **Tzvetanova E.**, Kirkova M, Zamfirova R., Leskiewicz M., Kubera M., Lason W.I., Todorov S. Studies of cytotoxicity and antioxidant capacity of N/OFQ(1-13)NH₂ and its structural analogues. VI-ти Национален Конгрес по Фармакология: Фармакологията – от експеримента към клиниката, хотел „Журналист”, Златни пясъци, Варна (октомври 2009). VI National Congress of Pharmacology, October 2009, Varna, Bulgaria.

5. Alexandrova A., **Tzvetanova E.**, Georgieva A., Tsanova A., Vircheva S., Nenkova G. Effects of structural analogues of N/OFQ(1-13)NH₂ on brain antioxidant status in kainic acid – treated rats. 4th International Congress of Molecular Medicine, 27-30 June, 2011, Istanbul, Turkey

6. **Tsvetanova E.**, Vircheva S., Georgieva A. Biological activity of nociceptin and its new-synthetized structural analogues. VI Workshop on Biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, 28-30 November, 2011, Sofia, Bulgaria

7. **Tsvetanova E.**, Vircheva S., Georgieva A. Antioxidant activity of nociceptin and its new-synthetized structural analogues in rat liver and paw tissue. VII Workshop Biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, 27-29 November, 2012, Sofia, Bulgaria.

8. Alexandrova A., **Tzvetanova E.**, Georgieva A., Nenkova G.. Comparative study of the antioxidant activity of some nociceptin analogues. 23rd International Scientific Conference of the Union of Scientists in Stara Zagora “Challenges for scientists in relation of the new program for science and innovation of EU "HORIZON 2020", 6-7 June, 2013, Stara Zagora, Bulgaria.

8.3. Забелязани цитирания на публикациите, свързани с темата на дисертационния труд (до м. май 2014 г.)

Tzvetanova E., Nenkova G., Georgieva A., Alexandrova A., Girchev R., Kirkova M. (2011) **Effects of structural analogues of nociceptin (1-13)NH₂ on brain antioxidant status in kainic acid-treated rats.** Cell Biochemistry and Function; 29:135-141; IF 1.651

1. Bodnar, R.J. Endogenous opiates and behavior. Peptides. 2011; 38 (2): 463-522

Tzvetanova E., Pavlova A., Alexandrova A., Nenkova G., Petrov L., Kirkova M. and Girchev R. (2009). **Are Nociceptin(1-13)NH₂ and its structural analogue**

[ORN⁹]Nociceptin(1-13)NH₂ able to affect brain antioxidant status in control and kainic acid-treated rats? Cell Biochemistry and Function; 27(4):243-50;IF 1.515

1.Naydenova, E. , Todorov, P. *Nociceptin/orphanin (N/OFO) analogues: Chemistry and biology. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. 2011; 46(4): 333-348*

Zamfirova R., **Tzvetanova E.**, Alexandrova A., Petrov L., Mateeva P., Pavlova E., Kirkova M., Todorov S. (2009). **In-vivo effects of nociceptin on carragenan-induced inflammation: rat-paw oedema and antioxidant status.**Central European Journal of Biology; 4(2):170-178; IF 0.915

1.Bodnar, R.J. *Endogenous opiates and behavior. Peptides.2011; 38 (2): 463-522*

2.Karakus, E., Halici, Z. , Albayrak, A., Bayir, Y., Aydin, A., Unal, D., Cadirci, E., Ferah, I., Odaci, E. *Beneficial Pharmacological Effects of Levosimendan on Antioxidant Status of Acute Inflammation Induced in Paw of Rat: Involvement in Inflammatory Mediators. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology. 2013; 112(3): 156-163*