

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ**

Д-р Павел Тончев Краевски

**Модуляция от нестероидни и стероидни адюванти
на ноцицепцията и ефекта на някои аналгетици.
Невропатични и възпалителни експериментални модели
и клинични наблюдения**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователна и
научна степен “ДОКТОР”

Научна специалност: *03.01.24*

“Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)”

Научен ръководител:

Чл.кор. проф. д-р Мила Власковска, дм, дмн

София 2011

Дисертационният труд е написан на 163 страници и включва 40 фигури и 6 таблици. Използвани са 388 литературни източника. Във връзка с дисертационния труд са публикувани 8 научни статии. Участията в научни форуми са 17, като 4 са на световни и международни конгреси.

Изследванията са проведени: Лаборатория по интегративни и молекулни механизми на ноцицепцията и адикцията, Катедра по фармакология и токсикология, МУ София; Департамент по невробиология на адаптивните процеси, Институт по невробиология, БАН; Център по Молекулярна медицина, Каролински институт, Стокхолм, Швеция.

Дисертационният труд е разгледан и одобрен от Научния колегиум на Института по невробиология, БАН на 13.10.2011 г.

Дисертантът е завършил медицина през 1999 г. в МУ София. Има придобита специалност по “Ортопедия и травматология” през 2008 г. Работи като асистент в Катедрата по Ортопедия, Травматология и Реконструктивна Хирургия на ВМА София.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на 07.12.2011 г. от 14:00 часа, в заседателната зала на ИБЕИ, БАН, ул. “Акад. Г. Бончев”, бл. 23, ет. 2.

Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на Института по невробиология, БАН, ул. “Акад. Г. Бончев”, бл. 23, ет. 2.

София 2011

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ**

Д - р Павел Тончев Краевски

**Модуляция от нестероидни и стероидни адюванти
на ноцицепцията и ефекта на някои аналгетици.
Невропатични и възпалителни експериментални модели
и клинични наблюдения**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователна и
научна степен “ДОКТОР”

Област на висше образование: 7. *“Здравеопазване и спорт”*

Професионално направление: 7.1 *“Медицина”*

Научна специалност: 03.01.24 *“Фармакология (вкл. фармакокинетика
и химиотерапия)”*

Научен ръководител: Чл.кор. проф. д-р Мила Власковска, дм, дмн

Научно жури: Акад. Евгени Головински, дб, дбн
Проф. д-р Ирен Белчева, дм, дмн
Доц. д-р Димитър Масларов, дм
Доц. д-р Симеон Тодоров, дм
Чл.кор. проф. д-р Мила Власковска, дм, дмн

Официални рецензенти: Акад. Евгени Головински, дб, дбн
Проф. д-р Ирен Белчева, дм, дмн

София 2011

СЪДЪРЖАНИЕ

1. Въведение.....	3
2. Цел и задачи	7
3. Материали и методи.....	8
3.1. In vivo методи	8
3.1.1.Изследване на ноцицептивна възпалителна болка.....	8
3.1.2.Изследване на невропатична болка.....	11
3.1.3.Изследване на болкова чувствителност при опиоидна толерантност/зависимост.....	13
3.2. In vitro методи.....	15
3.3. Клинични изследвания	17
3.4. Статистически методи	18
4. Собствени резултати	18
4.1. Ефект на Metamizol и Parecoxib върху остра ноцицептивна болка	18
4.2. Модулиращ ефект на Benfotiamine върху аналгетичното действие на COX-инхибитори.....	21
4.3. Модулиращ ефект на анаболни стероиди върху аналгетичното действие на Metamizol	25
4.4. Клинични изследвания: аналгетичен ефект на Parecoxib и Meloxicam	27
4.5. Морфологични и фармакологични изследвания при експериментална “Neuropathia Diabetica Dolorosa”	30
4.6. Модулиращ ефект на Benfotiamine и Thiamine върху опиоидната аналгезия и толерантност / зависимост	34
4.7. Модулиращ ефект NOS-инхибитори върху опиоидната толерантност и $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake	41
5. Изводи	47
6. Приноси.....	48
7. Списък публикации свързани с дисертационния труд	49
8. Участия в научни форуми във връзка с научния труд	50
9. Summary.....	52

ВЪВЕДЕНИЕ

Лечението на острата и хронична болка е значим медицински проблем, който ангажира все повече научни и финансови ресурси. В съвременните индустриални общества един от всеки трима души е търсил лекарска помощ по повод остра или хронична болка. Това прави болката една от най-честите форми на хронично заболяване при лицата под 60 годишна възраст (Rapaport et al., 2004). Лечението на болката е най-старата лечебна дейност на човечеството. И на този фон впечатлява факта, че и до днес най-ефективни при лечението на тежката болка са най-старите лекарства, каквито са опиоидите. Те продължават да бъдат “златен стандарт” при лечението на малигнена болка. Опиофобията обаче беше едно от най-честите препятствия за ефективно противоболково лечение при бенигна болка. Сега се приема, че прилагането на опиоиди е показано при продължителна невропатична и ноцицептивна болка, когато с други средства не може да се постигне адекватна аналгезия. Висша цел на опиоидната терапия е премахването на болката и подобряване на качеството на живот (Breivik, 2005). Показанията за многократно прилагане на опиоидни аналгетици при бенигна болка са: (i) неуспех от прилагането на други аналгетични лекарства или методи, (ii) добро и продължително обезболяване с опиоидни аналгетици, (iii) предимствата от подобреното качество на живот са значително повече от риска и неблагоприятните последици от прилагането на опиоиди.

Продължителното прилагане на опиоиди обаче е свързано с неизбежна поява на сериозни нежелани странични ефекти (Manchikanti and Benyamin, 2009). Естествена консеквенция на това е засилване на интереса към изясняване на невроналните механизми на ноцицепцията и аналгезията и създаване на нови по-ефективни аналгетични лекарства и терапевтични алгоритми.

Един рационален подход може да бъде създаването на схеми за лечение на болката при които аналгетик се комбинира с адювант, които да повлияе благоприятно както аналгетичното действие, така и да намали и / или забави появата на нежелани странични ефекти. Търсенето на подходящи адюванти/модификатори при терапията с аналгетични лекарства е актуална фармакологична и клинична задача. Напоследък се публикуват данни за благоприятно адювантно действие на тиамини, стероиди,

ксантини (Cicero et al., 1996; Stracke et al., 1996; Winkler et al., 1999; Johansson et al., 2000; Sánchez-Ramírez et al., 2006; Sawynok, 2011). В последните няколко десетилетия се наблюдава ескалираща злоупотреба с анаболни стероиди извън техните медицински показания. Много автори съобщават, че анаболните стероиди се използват масово, както от професионално занимаващи се със спорт така и от любители, с цел повишаване на мускулната маса, подобряване на спортните постижения и интензифициране на тренировъчния процес (Wilson, 1988; Lukas, 1993; Yesalis and Bahrke, 1995; Kuhn, 2002). При това обаче се повлияват многобройни невробιологични процеси (Simerly et al., 1990), които водят до появата на различни по сила и характер психични и психологични ефекти (Pope and Katz, 1994). В реализирането на тези ефекти са вълечени опиоидергични и допаминергични механизми (Menard et al., 1995; Johansson et al., 2000). Понастоящем се приема, че анаболните стероиди се проявяват като “gateway drugs” за развитието на опиоидна зависимост (Arvary and Pope, 2000).

Острата болка съпътства ежедневието на всеки. Забавеният и неадекватен контрол върху нея има за резултат висока морбидност и води до множество анатомични и функционални изменения в ЦНС (невропластичност), които са в основата на хронична невропатична болка.

Неотдавна Световната здравна организация предложи на Общото събрание на ООН да включи като свой приоритетен принцип становището, че “Лечението на болката е общочовешко право и морален и професионален дълг на лекаря” (Cousins et al., 2004).

В медицинската общественост все повече се застъпва мнението, че “Хроничната болка е заболяване” (Niv and Devor, 2004). Тази болка се дефинира като „Болка, която персистира по-дълго от нормалното време за оздравяване на увреденият тъкан, което се приема, че е 3 месеца” (Merskey and Bogduk, 1994). По литературни данни 20% от всички хора и 50% от възрастното население страдат от хронична болка. Заради болка 21% от болните са изпаднали в депресия, 19% са загубили работата си, а 61% са били с понижена работоспособност. Над 40% от тях съобщават, че лечението им е било неадекватно (Breivik, 2005). Това убедително показва, че лечението на хроничната болка е много съществен проблем пред здравеопазването в EU. Особено внимание трябва да се отдаде на хроничната болка при невропатии с различна етиология (злокачествени

заболявания, метаболитни нарушения, посттравматични усложнения, СПИН и др).

В настоящото проучване са представени клинични и експериментални данни за действието на някои от най-често използваните в медицинската практика опиоидни и неопиодни аналгетици и за благоприятния ефект, по отношение силата на тяхното аналгетично действие и облекчаването на някои от предизвиканите от тях нежелани странични ефекти, при суплиментирането им с Benfotiamine или Thiamine. Обобщените в този труд данни, за благоприятните ефекти на Benfotiamine и Thiamine при лечението на тежки болкови синдроми, са едни от първите публикувани в литературата.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на Ръководството и целия екип на Института по Невробиология на БАН, за възможността да бъда докторант там.

Бих искал да изразя най-искрената си благодарност и признателност на моите учители, колеги и приятели *проф. д-р Мила Власковска* и *проф. д-р Любомир Казаков*, които щедро споделиха с мен своите знания и опит.

Искам да изкажа огромната си благодарност към колегите от Катедрата по Фармакология и Токсикология на МУ София, с които съм работил. Специално благодаря на *доц. д-р Славина Сурчева* и *проф. д-р Лъчезар Сурчев*.

Този труд нямаше да бъде написан без голямата подкрепата и съпричастност на моето семейство.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цели

1. Изследване на ноцицепцията при експериментални модели на остра и хронична болка чрез съвременни фармакологични и морфологични методи.
2. Проучване антиноцицептивното действие на съвременни аналгетични лекарства с клинично значение при експериментални и клинични изследвания.
3. Изследване възможностите за фармакологична модулация на ноцицепцията и симптомите на толерантност/зависимост при остра и хронична болка чрез адюванти.

Задачи

1. Изследване действието на Benfotiamine/Thiamine, Testosterone/Nandrolone и NOS-инхибитори като възможни адюванти при опиоидна и неопиоидна аналгетична монотерапия.
 - 1.1. Модулиращ ефект на Benfotiamine върху аналгетичното действие на COX-инхибитори при инфламаторна хипералгезия.
 - 1.2. Модулиращ ефект на Benfotiamine/Thiamine върху аналгетичното действие на Morphine и опиоидна толерантност/зависимост.
 - 1.3. Модулиращ ефект на Testosterone/Nandrolone върху аналгетичното действие на Metamizol.
 - 1.4. Модулиращ ефект на NOS-инхибитори върху опиоидна толерантност и $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake.
2. Изследване на морфологичните промени и възможностите за фармакологично повлияване на болката при модел на "Neuropathia Diabetica Dolorosa".
3. Експериментални и клинични проучвания на неопиоидни аналгетици при остра постоперативна болка.
 - 3.1. Разработване и валидизиране на експериментален модел на остра постоперативна болка и сравнително изследване на аналгетичния ефект на Analgin (Metamizol) и Dynastat (Parecoxib).
 - 3.2. Клинични изследвания на аналгетичния ефект на Dynastat (Parecoxib) и Movalis (Meloxicam) при остра постоперативна болка.

D. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

D.1. In vivo методи

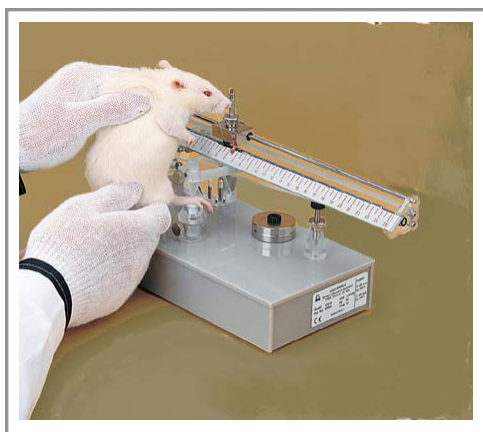
Използвани са набор от фармакологични тестове за изследване на болка и аналгезия.

Експериментите in vivo бяха проведени върху мъжки бели плъхове (Wistar, с тегло 180-200 g). В зависимост от провежданите експерименти животните бяха разпределяни в групи от 6-12. Доставяни бяха от централен вивариум, при спазване на стандартни условия за отглеждане и 12 часов цикъл светло/тъмно, със свободен достъп до храна и вода. Спазвани бяха Международните Насоки и Принципи за Експерименти с животни (IGPAR). Дизайнът на експериментите бе съгласно процедура одобрена от етичната комисия (КЕНИМУС) на МУ-София.

D.1.1. Изследване на ноцицептивна възпалителна болка

D.1.1.1.Тестове

Paw Pressure Test (PPT). Това е класически тест базиран на метода, описан от Randall & Selitto (Randall & Selitto, 1957). Метода се прилага за бърз скрининг на аналгетични и противовъзпалителни средства. Проведен е с Analgesy-Meter, Model 37215, Ugo Basille, Italy (*Фигура D1*).



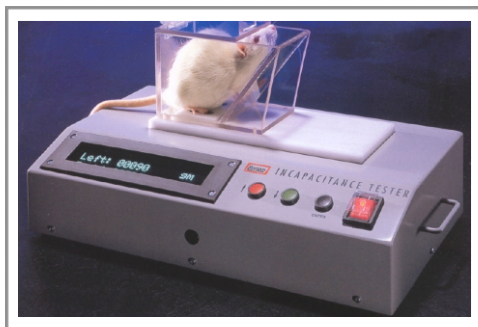
Фигура D1. Paw Pressure Test.

Отчита се силата на натиска в относителни единици, при която животното отдръпва лапата си.

Принципът на действие на аналгезиметъра е упражняване на натиск върху лапата на плъха с помощта на лост, по който с постоянна скорост (40

mm/s) се приплъзва тежест (74g). На лоста е прикрепен пластмасов конус, който се поставя върху лапата, като площта му при върха е 1.4 mm². Апарата е снабден с педал-ключ, чрез който оператора стартира и спира изследването. Животното свободно може да отдръпне лапата си в момента, в който силата на натиска надвиши прага на болковата му чувствителност. Натиска се отчита по линейна скала като относителни PPT-единици (PPT-Units). След стартиране на изследването се прилага постепенно увеличаващ се натиск (до 500 гр.) върху задната лапа на животното. Степента на аналгезия се отчита по специфична двигателна реакция на животното, която се състои в отдръпване на лапата при достигане на болков праг.

Incapacitance Test (IT). Тестът е проведен с Incapacitance Tester (Small Animal Model), Linton Instrumentation, England (*Фигура D2*).



Фигура D2. Incapacitance Test.

Животното е поставено така, че да пренася цялата тежест на тялото върху задните крайници. Разпределението на тежестта корелира със силата на болката, която изпитва.

Той позволява да се отчете разпределянето на тежестта на тялото върху задните крайници. Отчитат се две стойности, показващи колко от телесното теглото (g) е пренесено върху всеки един от крайниците. Голямото предимство на този тест е това, че в момента на измерването животното е оставено напълно самостоятелно. По този начин напълно се избягва влиянието на експериментатора. По това до каква степен животното щадя увредената си лапа, можем да съдим за силата на болката, която изпитва. За унифицирано представяне на данните използвахме по-рано разработена в нашата лаборатория методика (Нашар, 2007), при която отговорите се стандартизират чрез отношението на натиска упражняван от всеки от двата задни крайника (IT-индекс). При IT-индекс равен на 1, натиска се разпределя еднакво между двата долни крайника. При

отношение увреден към здрав крайник, IT-индекса е по-малък от 1, и обратно при отношение здрав към увреден крайник той е по-голям от 1.

Plethysmometry. Изследването бе осъществено с Plethysmometer, Model 7140, Ugo Basile, Italy (*Фигура D3*).



Фигура D3. Plethysmometer. Обема на лапата (ml) се отчита на базата на водоизместимостта.

Плетизмометърът представлява два цилиндъра свързани на принципа на скачениите съдове, единият от които е снабден с двойка електроди. Когато съдовете са пълни с течност (електролит), потапянето на лапата променя нивото на течността и това води до изменение в провеждането между двата електрода. Регистрираните промени във водоизместването се отчитат в милилитри върху електронен дисплей.

D.1.1.2.Модели

Карагенинова хипералгезия. Експеримента е базиран на методика описана от (Winter et al., 1963). Хипералгезията бе предизвикана чрез субплантарно инжектиране на 0,1 ml 1% разтвор на Carrageenan в 0.9% NaCl, при което се развива остра асептична възпалителна реакция. Болковата чувствителност и отока се определяше на 1, 2, 3 и 24-тия час след

инжектирането. Аналгетичният ефект се отчиташе в относителни единици издържан натиск върху лапата на животното (Randall & Selitto, 1957). Противовъзпалителният (антиексудативен) ефект се изчисляваше като процент на инхибиция по формула на Trinus & Mohar или като отношението на обемите на болната и здравата лапа изразено в относителни единици (RU).

Адювантен артрит на Фройнд. Артрит се предизвикваше с пълен адювант на Фройнд (CFA, маслена суспензия на убити туберкулозни бактерии, 6×10^6 бактерии/ml). Субплантарното инжектиране на плъховете с 0.1 мл/лапа от адювантът на Фройнд води до развитие на автоимунна възпалителна реакция и развитие на полиартрит. Реакцията протича в две фази: остра - в първите 3-5 дни и хронична - след седмия ден, когато автоимунния възпалителен процес обхваща ставите. Важна характеристика на този модел е тежката хипералгезия. По параклинични и патоморфологични промени този модел наподобява ревматоиден артрит при човек.

D.1.2. Изследване на невропатична болка

D.1.2.1. Тестове

Von Frey Hair Test (FHT). Базиран е на класическия von Frey Hair Test. Изследването бе осъществено с Dynamic Plantar Aesthesiometer, Model 37400, Ugo Basile, Italy (*Фигура D4*), като се използват различно ригидни филаменти (von Frey).



Фигура D4. Von Frey Test. При определена степен на натиск, животното отстранява съответната лапа, като в този момент апаратът отчита латенция (sec) и силата на натиск (g).

Филамента се издига перпендикулярно с постоянна скорост и упражнява натиск към средната трета на плантарната повърхност на съответната лапа на животното. Задават се cut-off стойности на натиск върху лапата до 50 g или на време за реализиране на натиска до 20 sec.

Heath Plantar Test (HPT). Тестът е базиран на оригиналния метод описан от Hargreaves (Hargreaves et al., 1988). Проведен е с Plantar Test (Hargreaves' Method), Model 7370, Ugo Basile, Italy (*Фигура D5*).



Фигура D5. Heath Plantar Test.

При отдръпване на лапата, датчика отчита промяна в отразената светлина, като момента се регистрира от таймер.

Метода се състои в прилагане на еталониран инфрачервен лъч от подвижен източник, насочен перпендикулярно към средата на плантарната повърхност на лапата. Подвижният източник притежава датчик, който отчита отразената от лапата светлина. Предварително животните са поставени в прозрачен плексигласов съд, които е повдигнат над работната маса и са оставени да се адаптират за около 20 min. След като опитното животно почувства болка, то отръпва лапата си, при което датчика регистрира липсата на отразена светлина и таймер отчита латентното време. При латентно време над 20 sec изследването се преустановяваше, за да се избегне термично увреждане.

D.1.2.2. Модели

Диабетна полиневропатия. Диабетна полиневропатия беше предизвикана с еднократно инжектиране на Streptozotocin (STZ, 75 mg/kg,

i.p.). Хипергликемия над 14 mM/l съчетана с полиурия се наблюдаваше след 3-тия ден, което се считаше за начало на диабет тип I. За хистоморфологична верификация се изследваха срези от n.ischiadicus взети 15-20 ден след въвеждане на STZ или физиологичен разтвор. Неврологичните увреди се изразяват първоначално с нарушаване на тактилната ноцицептивност (алодиния) последвано от нарушаване и на термичната ноцицептивност.

Констриктивна лигатура на n.ischiadicus. Хроничната констриктивна увреда на седалищния нерв беше извършена по метод описан от (Seltzer et al., 1990).

Накратко метода се състои в налагане на хлабава двойна лигатура, която обхваща 1/3 до 1/2 от ствола на десния седалищен нерв, проксимално от клона на n.femoralis. Операцията се извършва под пълна анестезия (Nembutal 12 mg/kg и Calypsol 50 mg/kg i.p.), спазвайки асептична техника. Постоперативно еднократно се прилага Gentamycin (8 mg/kg). Изразена алодиния се развива на 12-15 ден след налагане на лигатурата.

D.1.3. Изследване на болкова чувствителност при опиоидна толерантност/зависимост

D.1.3.1. Тестове

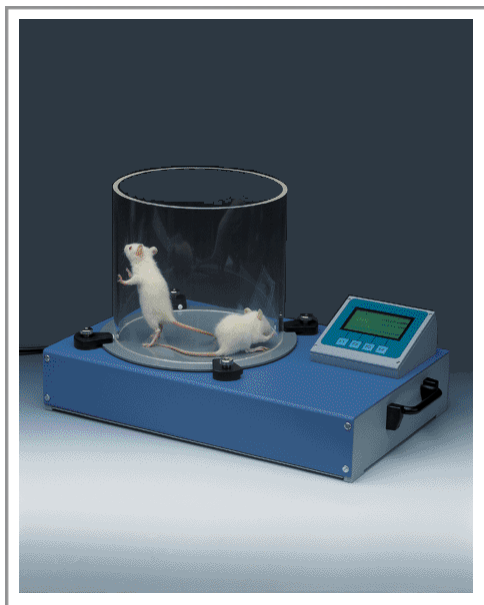
Tail-Flick Test (TFT). Тестът е базиран на метод описан от D'Amour & Smith (D'Amour and Smith, 1941). Проведен е с Tail-Flick Test, Model 7360, Ugo Basile, Italy, проектиран за точно измерване на ноцицептивния праг от термичен стимул (еталониран инфрачервен лъч) върху опашката на плъх (Фигура D6).



Фигура D6. Tail-Flick Test. Инфрачервеният лъч е фокусиран в областта проксимална/средна трета на опашката, като времето за което животното я отдръпва се отчита с таймер.

Източника на лъчение е свързан с пусков педал-ключ за стартиране и автоматичен таймер, отчитащ времето за отдръпване на опашката. При латентно време над 20 sec изследването се преустановяваше, за да се избегне термично увреждане.

Hot Plate Test (HP). Тестът е базиран на метод, както е описан от Eddy & Leimbach (Eddy and Leimbach, 1953). Проведен е с Hot Plate Analgesy Meter, Model 7280, Ugo Basile, Italy (*Фигура D7*).



Фигура D7. Hot plate test. Отчита се времето, за което животното близва задната си лапа.

Метода се състои в поставяне на животните в прозрачен контейнер, пода на който е гореща плоча с регулируема температура и отчитане на времето за което животното реагира. Температурата на плочата беше фиксирана на $51^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Отчитано бе времето, за което животното повдига/близва една от задните си лапи (латентно време). След изтичане на 60 sec измерването се преустановяваше, за да се избегне термично увреждане. При фоновите измервания това време (cut-off) бе 30 sec.

Ноцицептивните прагове, определени с TFT и HP, бяха дефинирани като латенции (sec) от началния момент на прилагане на ноцицептивния

стимул, до момента на реакция на животното, показваща началото на болковото усещане.

Резултатите от TFT и HP бяха изчислени като максимален възможен ефект (МВЕ, %), по формулата:

$$\frac{\text{Test latency} - \text{Basal latency}}{\text{Cut-off latency} - \text{Basal latency}} \times 100$$

D.1.3.2. Модели

Модел на Morphine-предизвикана толерантност/зависимост. С цел предизвикване на толерантност/зависимост към аналгетичния ефект на Morphine той бе въвеждан сутрин (8:00 - 9:00) и вечер (18:00 - 19:00) в дози 5 mg/kg s.c. в продължение на единайсет последователни дни. Ноцицептивните прагове се изследваха на 1, 3, 5, 7, 9 и 11 ден, след сутрешното инжектиране на Morphine. Ежедневно се проследяваше състоянието на животните за поява на абстинентни симптоми.

Модел на Naloxone-предизвикан “абстинентен” синдром. Naloxone-предизвикания “абстинентен” синдром (абстиненция) у експериментални животни може да се приеме за еквивалент на опиоидна (Morphine) абстиненция при хората. У морфин зависими плъхове абстиненция се предизвикваше на 11 ден чрез въвеждане на 1 mg/kg Naloxone i.p.

Всяко животно се оставяше свободно под стъклена фуния и проявите на Naloxone-предизвикана абстиненция се отчитаха едновременно от две лица в течение на два последователни 10 min интервала. Освен проявите на физическа зависимост (диария, промяна в теглото) се проследяваха и централни прояви (отръскване, изправяне на задни лапи, писък при допир и други поведенчески реакции). Абстинентните проявите на всяко отделно животно се верифицираха чрез създадена от нас точкова скала за 10 min период и за целия период на наблюдение и стойностите се осредняваха за съответната група.

D.2. In vitro методи

Хистохимични изследвания. Морфологичните промени бяха наблюдавани с трансмисионен електронен микроскоп (Hitachi H-500).

Предварително животните бяха перфузирани с разтвор на Karnovsky (2% Paraformaldehyde и 2.5% Glutaraldehyde в 0.1 М фосфатен буфер). Тъканните препарати от седалищния нерв бяха взети в периода 15-20 ден след STZ-въвеждане и обработени, както е описано по-рано (Surchev et al., 2008). Накратко, препаратите бяха дехидратирани, фиксирани в OsO_4 и вградени в блокчета от Durcupan, нарязани на ултратънки срезове и оцветени с оловен ацетат и уранил ацетат за електронна микроскопия.

Клетъчна токсичност. Използвани бяха първични клетъчни култури от кортикални неврони от главен мозък на новородени Sprague-Dawley плъхове (1 ден след раждане), получени по метод на Alho et al. (Alho et al., 1988) с модифиции по Vlaskovska et al. (Vlaskovska et al., 1997). Клетъчната токсичност се определяше с MTT (Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide) тест на Carmichael et al. (Carmichael et al., 1987), при който цитотоксичността (cell toxicity) се определя индиректно по количеството на преживелите клетки (cell viability). Клетките се измиват трикратно и се инкубират с разтвор на Locke 5 mM K^+ , съдържащ (mM): NaCl 149, KCl 5, MgCl_2 1, NaHCO_3 4, HEPES 10, CaCl_2 2.3, Glucosae 5, pH 7.5, без или с L-Arg, L-NAME, L-Can, NoCan, NoCanMe, всеки с крайна концентрация 0.1 mM, 0.5 mM и 1 mM. След 60 min инкубация към всяко гнездо се добавят 0.3 mg/ml MTT и се инкубират отново в продължение на 60 min. Редукцията на MTT от клетките се определяше чрез microplate autoreader (Biotec Instruments) при дължина на вълната 490 nm срещу 650 nm.

Определяне на стимул-предизвикан $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake. (Част от експериментите са проведени в центъра по Молекулярна медицина, Каролински Институт, Стокхолм, Швеция). Определянето на $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake беше осъществено по методика описана по-рано (Власковска, 2002). Накратко метода се състои в следното: Към първична клетъчна култура от кортикални неврони на плъх се прибавя изследваната субстанция и се инкубира 30 min. При стайна температура клетките се промиват трикратно с 0.5 ml разтвор на Locke 5 mM K^+ , съдържащ (mM): NaCl 149, KCl 5, MgCl_2 1, NaHCO_3 4, HEPES 10, CaCl_2 2.3, Glucosae 5, pH 7.5, без или с L-NAME, NoCan или NoCanMe, всеки с крайна концентрация 0.1 mM или 0.5 mM. След това клетките се инкубират за 5 min с 0.25 ml медиум съдържащ 10^6 CPM/ml $^{45}\text{Ca}^{2+}$. За стимул-предизвикан $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake се прилагаше K^+ -деполяризация с разтвор на Locke съдържащ 50 mM K^+ или разтвор на Locke съдържащ 5

mM K⁺ и 10 или 50 uM Glutamate в продължение на 5 min. Всеки от разтворите съдържа 10⁶ CPM/ml ⁴⁵Ca²⁺. След това клетките се измиваха със стандартен разтвор на Locke, съдържащ 0.2 uM или 2 uM МК-801 за отстраняване на остатъчната екстрацелуларна радиоактивност и се разтваряха в 0.5 ml 0.1 M NaOH. Едно и също третиране се използваше върху произволно избрани 2 или 3 гнезда от плейта. За статистическа обработка се приемаха стойности получени от най-малко две тъканни култури. ⁴⁵Ca²⁺ се определяше чрез радиосцинтиграфия Beckman. Всички резултати са изразени като nM ⁴⁵Ca²⁺ поет за 5 min от 3x10⁶ клетки.

D.3. Клинични изследвания

D.3.1. Пациенти и хирургични интервенции

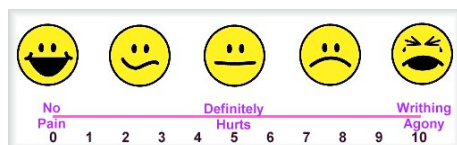
Изследванията са проведени с пациенти от двата пола в първите 48 часа след ендопротезиране на колянна или тазобедренна става извършено под обща инхалационна анестезия и с пациенти от двата пола в първите 48 часа след артроскопски интервенции на колянна става извършени под спинална анестезия.

Критерий за включване на пациентите в изследването бяха стойности на Индекс на телесна маса (ИТМ) за съответния пол и възраст $\pm$ 15-20% от нормата. Според СЗО за нормални стойности при мъжете се приемат тези между 20-25, а за жените между 19-24. При възрастните индивиди ИТМ до 26 се счита за норма. Критерии за изключване на пациентите от изследването бяха наличие на болестни състояния променящи ноцицептивното възприятие.

Всичките пациенти бяха подписали информирано съгласие и техните данни използвани в настоящото проучване бяха анонимизирани.

D.3.2. Оценка на постоперативната болка

Постоперативната болка беше оценявана с помощта на визуална аналогова скала (ВАС), показана на *Фигура D8*. Пациентите бяха инструктирани как да оценяват субективното си усещане за болка в относителни ВАС единици (ВЕ). Болката беше отчитана на 4, 8, 12, 22, 26, 32 и 48 час след края на оперативната интервенция.



Фигура D8. Визуална аналогова скала. Пациента определя степента на болката, която се оценява в единици от 1 до 10.

D.4. Статистически методи

Статистическа обработка на резултатите бе извършена чрез компютърна програма GraphPad Prism 5 (Mac OSX), като се използваша one-way ANOVA, последвано от Bonferroni, Dunett и Chi-square тестове. Статистическата значимост бе дефинирана $P < 0.05$. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ SEM.

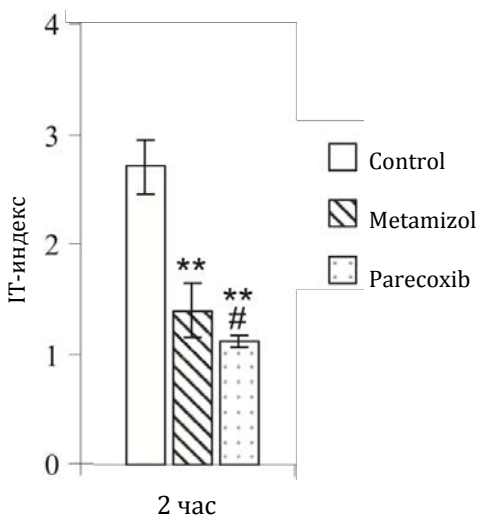
E. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

E.1. Ефект на Metamizol и Parecoxib върху остра ноцицептивна болка

В тази серия експерименти беше използван инцизионен модел на остра хирургична болка по (Brennan et al. 1996). Накратко метода се състоеше в извършване на едностранна плантарна инцизия с дължина 1 см под краткотрайна повърхностна анестезия. Надлъжно се инцизираха кожа, подкожие, мускули и плантарна фасция, след което оперативната рана беше затворена с кожна сутура. След 2 часа на изследваните животни се определяха ноцицептивните прагове и степента на алодиния.

Схема на третиране. Използвани бяха три групи животни: контролна група, третирана с физиологичен разтвор; група третирана непосредствено преди и след оперативната интервенция с Metamizol 150 mg/kg, i.p.; група третирана непосредствено преди оперативната интервенция с Metamizol 150 mg/kg, i.p. и след оперативната интервенция с Parecoxib 5 mg/kg, i.p.

Данните получени с Incapacitance Test (IT) показаха, че животните от контролната група щадят в голяма степен оперирания крайник и разпределят основната маса на тялото си върху здравия крайник. Както се вижда от *Фигура E1* отношението на натиска на неоперирания и оперирания крайник е над 2.5. Това отношение намалява до 1.5 в групата третирана с Metamizol. Това означава, че нивото на острата инцизионна болка е намаляло значително и животното щадя увредения крайник в много по-малка степен. В групата третирана с Parecoxib IT-индекса е близо 1, което демонстрира, че с комбинацията Metamizol / Parecoxib се постига по-ефективна аналгезия (*Фигура E1*).



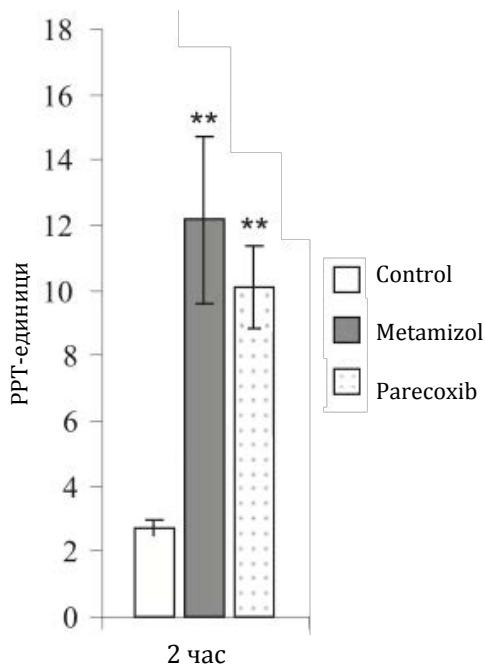
Фигура Е1. Аналгетичен ефект на Metamizol и Parecoxib при остра инцизионна болка (IT). ** $p < 0.01$ vs. контрола; # $p < 0.05$ vs. Metamizol

В следваща серия експерименти с Paw Pressure Test (PPT) беше изследван ефекта на Metamizol и Parecoxib върху механична хипералгезия (Фигура Е2).

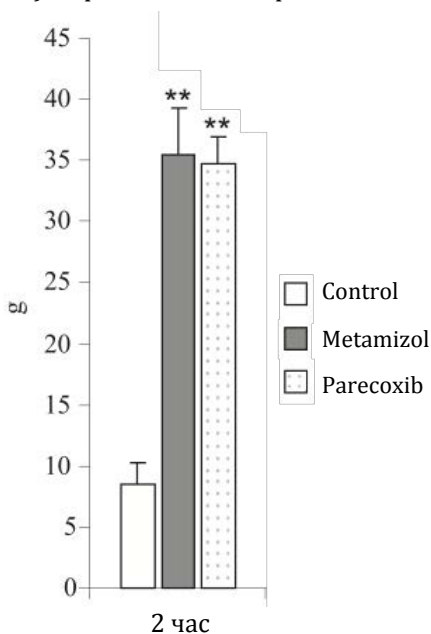
Както се вижда от Фигура Е2, както в групата третирана с Metamizol, така и в групата третирана с Parecoxib се наблюдава силно изразен аналгетичен ефект. Фигурата показва също, че няма статистически значима разлика в степента на аналгезия при двете схеми на третиране.

В друга серия експерименти с Von Frey Hair Test (FHT) беше установен силно изразен аналгетичен ефект при тактилна алодиния, както в групата третирана с Metamizol, така и в групата третирана с Parecoxib (Фигура Е3). Фигурата показва също, че няма статистически значима разлика в степента на аналгезия при двете схеми на третиране.

Анализ на резултатите. Данните показват, че Metamizol и Parecoxib намаляват както механичната хипералгезията, така и тактилната алодиния. Parecoxib е по-ефикасен спрямо механичната хипералгезия, отколкото спрямо тактилна алодиния в периода непосредствено след хирургичната интервенция. Аналгетичното действие на Metamizol обаче се запазва през целия постоперативен период с еднаква сила както спрямо механичната хипералгезията, така и спрямо тактилната алодиния.



Фигура Е2. Аналгетичен ефект на Metamizol и Parecoxib при механична хипералгезия (PPT). ** $p < 0.01$ vs. контрола



Фигура Е3. Аналгетичен ефект на Metamizol и Parecoxib при тактилна алодиния (PPT). ** $p < 0.01$ vs. контрола

Експерименталните резултати показват, че аналгетичния ефект на Parecoxib приложен еднократно се потенцира след претретиране с Metamizol.

Е.2. Модулиращ ефект на Benfotiamine върху аналгетичното действие на COX-инхибитори

Схема на третиране. Benfotiamine беше прилаган ежедневно в дози 10, 50 или 100 mg/kg, р.о. пет дни преди и през целия период на Carrageenan/CFA-предизвикана възпалителна хипералгезия. Проследен беше ефекта на Benfotiamine върху аналгетичното действие на следните НСПВС: Indomethacin (2 и 5 mg/kg, р.о.), Ibuprofen (20 и 40 mg/kg, р.о.) и Dynastat (5 mg/kg, i.p.). Ноцицептивните прагове бяха определяни с РРТ и IT тестове.

В пилотни експерименти беше намерено, че еднократно прилагане на Benfotiamine в тези дози не променя базалната ноцицепция.

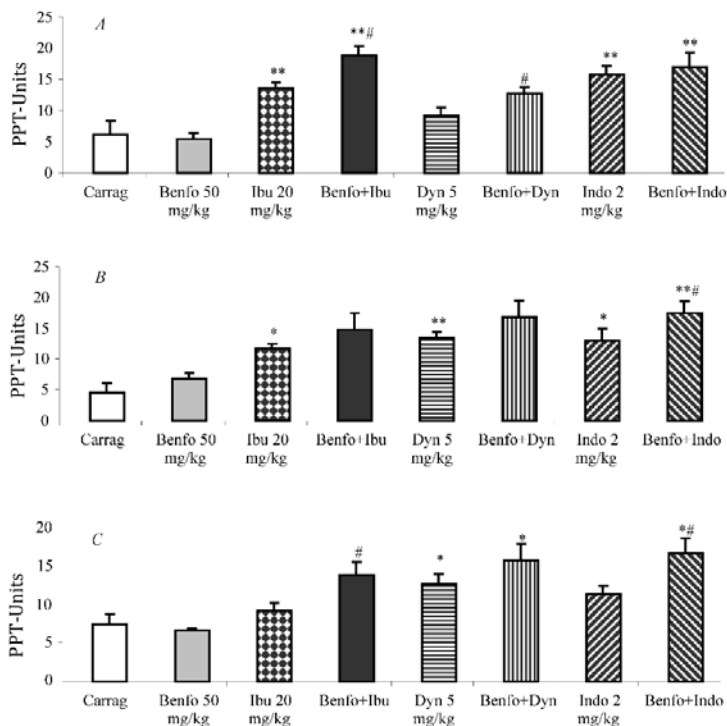
Инжектирането на Carrageenan предизвиква изразена остра инфламаторна реакция в първите 3 часа. *Фигура Е4* показва, че ноцицептивния праг във възпаления крайник се понижава значително (4.58 ± 0.1) в сравнение с невъзпаления крайник (12.3 ± 2.8), с максимален ефект на 2-рия час. Самостоятелно приложени използваните НСПВС имат изразен аналгетичен ефект (*Фигура Е4, Е5 и Е6*). Комбинирането с Benfotiamine потенцира статистически достоверно аналгетичното действие на използваните НСПВС, проследено на 1-ви, 2-ри и 3-ти час след началото на възпалителната реакция (*Фигура Е4*).

Фигура Е5 показва изразена хипералгезия през острата фаза на CFA-индуцираното възпаление. Задълбочаващата се хипералгезия се илюстрира отчетливо с прогресивното намаляване на IT-индекса от 1-вия до 3-тия час.

В острата фаза Benfotiamine показва тенденция за повишаване на ноцицептивния праг на 1-вия и 2-рия час. Този ефект е статистически достоверно верифициран с IT (*Фигура Е5.В*). Ibuprofen има изразен аналгетичен ефект, който се манифестира по-отчетливо при IT. През тази фаза комбинираното прилагане на Ibuprofen с Benfotiamine засилва аналгетичния ефект (*Фигура Е5.А, В*). В друга серия експерименти, подобен

ефект беше установен и при комбинирано прилагане на Dynastat с Benfotiamine (*Фигура E5*).

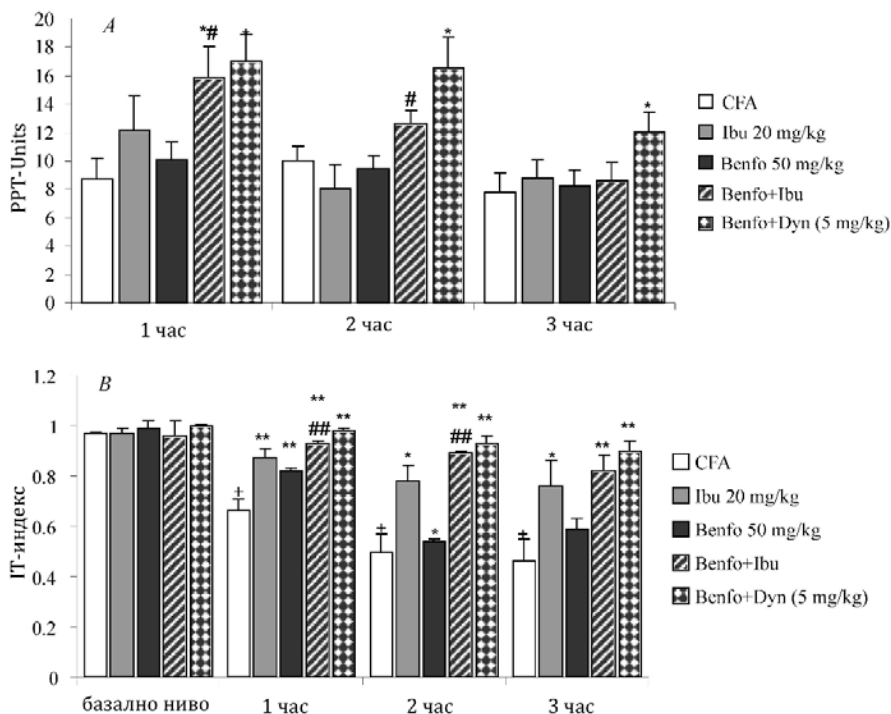
Плетизмометрични изследвания показаха че Benfotiamine не повлиява антиексудативния ефект на използваните НСПВС.



Фигура E4. Влияние на Benfotiamine върху аналгетичния ефект на Indomethacin, Ibuprofen и Dynastat при Carrageenan-индуцирана хипералгезия. Paw pressure test: *A* - 1-ви час; *B* - 2-ри час; *C* - 3-ти час след въвеждане на Carrageenan (Carrag); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Carrageenan, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. единична апликация на Ibuprofen (Ibu), Indomethacin (Indo) или Dynastat (Dyn)

Промените при CFA-индуцирания артрит бяха проследени 21 дни от началото на възпалителната реакция. През хроничната фаза настъпва генерализация на процеса, който обхваща голям брой големи стави и се

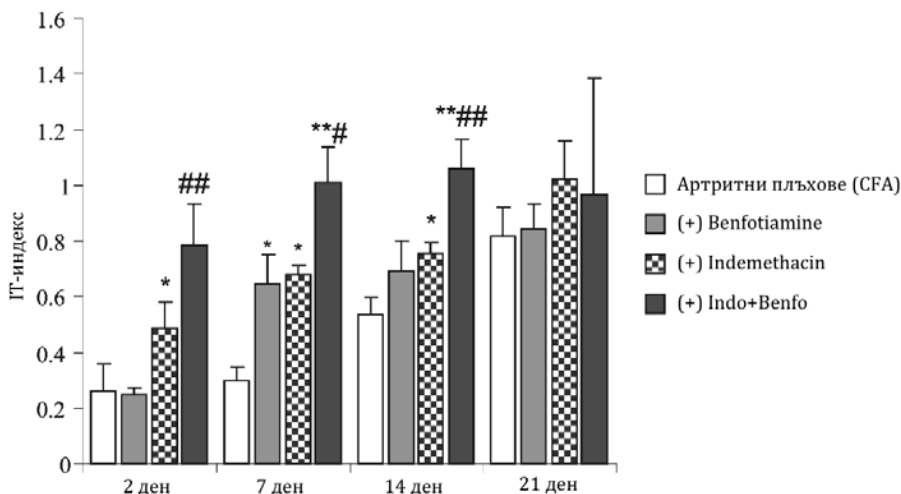
характеризира с пролиферативно деструктивно/некротични изменения на ставите и околните тъкани. След острата фаза на тежка хипералгезия след 2-рия до 21 ден на хроничната фаза настъпва постепенно облекчаване на болковия синдром (Фигура Е6).



Фигура Е5. Ефект на Benfotiamine при CFA-индуцирана хипералгезия (остра фаза): *A*. Промени в болковите прагове; raw pressure test; *B*. Промени в IT-индекса; incapacitance test; IT-индекс - incapacitance test - индекс; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. CFA; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. единична апликация на Ibuprofen или Dynastat, + $p < 0.05$ vs. базално ниво

Самостоятелното прилагане на Benfotiamine в хроничната фаза предизвиква по-отчетлив аналгетичен ефект в сравнение с острата фаза. В тази фаза животните бяха третирани с НСПВ лекарство средство Indomethacin в продължение на 21 дни. Самостоятелно прилаган Indomethacin показва добре изразено противовъзпалително/аналгетично

действие. Комбинираното прилагане на Benfotiamine и Indomethacin доведе до значително потенциране на аналгетичния ефект (*Фигура Е6*).

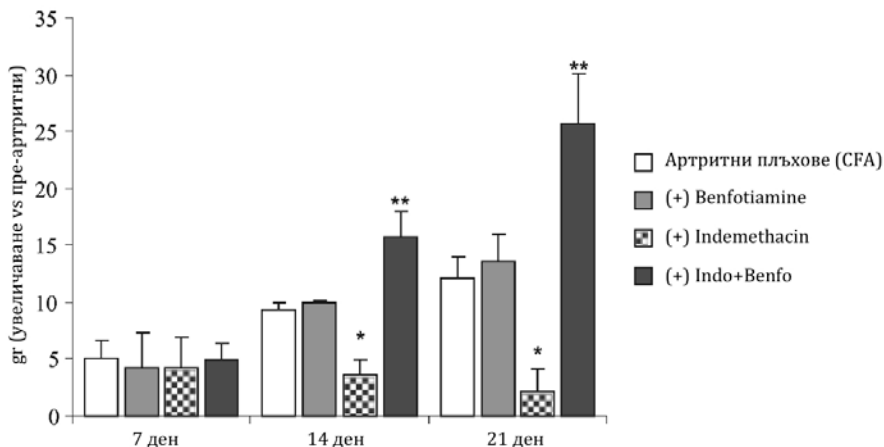


Фигура Е6. Ефект на Benfotiamine и Indomethacin при CFA-индуцирана хипералгезия (хронична фаза). Incapacitance test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. CFA; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Indomethacin

Паралелно бяха проследявани промените в телесната маса на изследваните животни. Както показва *Фигура Е7* в рамките на изследвания период се наблюдава слабо изразено увеличение на телесната маса. Аналогичен беше ефекта при самостоятелно прилагане на Benfotiamine. За разлика от това самостоятелното прилагане на Indomethacin водеше до статистически достоверно намаляване на телесната маса. В контраст на това комбинираното прилагане на Indomethacin и Benfotiamine предизвика не само че премахна ефекта на Indomethacin но и доведе до неколкосткратно по-големи позитивни промени на телесната маса на животните (*Фигура Е7*).

Анализ на резултатите. Данните показват, че суплементацията с Benfotiamine към терапията с COX-инхибиторите Indomethacin, Ibuprofen или Dynastat увеличава техния аналгетичен ефект и подобрява значително общото състояние на изследваните животни но не променя тяхното антиексудативно действие. Сходен благоприятен ефект се наблюдава и при

суплементиране с Benfotiamine при хронично третиране с изследваните СОХ-инхибитори. Тези данни позволяват да се допусне, че комбинирането на СОХ-инхибитори с Benfotiamine може да засили тяхното аналгетично действие и да намали появата на предизвиканите от тях нежелани лекарствени реакции.



Фигура Е7. Промени в телесното тегло при продължително приложение на Benfotiamine (10 mg/kg) и Indomethacin (2 mg/kg). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. CFA

Е.3. Модулиращ ефект на анаболни стероиди върху аналгетичното действие на Metamizol

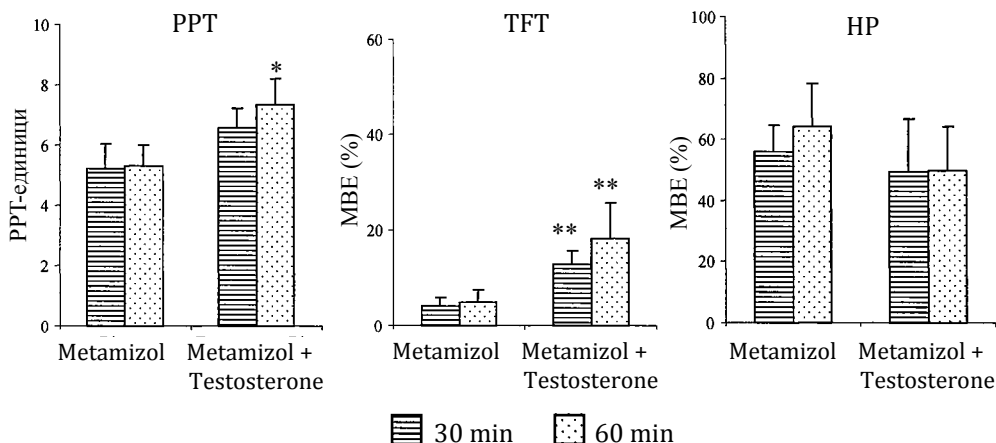
Схема на третиране. Използваните животни бяха орхидектомирани и разделени на три групи от по 10 животни всяка. Хирургическата интервенция се извършваше при асептични условия под пълна анестезия с Nembutal 10 mg/ml/kg, i.p. и Ketamine 60 mg/ml/kg, i.p. и локално приложен Lidocain 20 mg/ml/kg. Постоперативно еднократно се прилагаше Gentamycin (8 mg/ml/kg, i.m.) и 20 mg локално приложен Sulfathiazole. След операцията животните се оставяха в единични клетки в продължение на 10 дни за възстановяване при стандартни лабораторни условия.

Testosterone depot (25 mg/ml/kg, i.m.) се прилагаше всеки четвърти ден. Nandrolone (5 mg/ml/kg, i.m.) се прилагаше всеки втори ден. След четири последователни апликации на съответния анаболен стероид се прилагаше Metamizol в доза 150 mg/ml/kg, i.p. или физиологичен разтвор в

доза 1 ml/kg, i.p. Аналгетичния ефект се изследваше чрез PPT, TFT и HP тест на 30 и 60 min след въвеждането на Metamizol.

Максималният аналгетичен ефект на Metamizol се достигаше 30-40 min след въвеждането и продължаваше до 90-120 min.

Резултатите показаха, че след третиране с Testosterone аналгетичния ефект на Metamizol се засилва, което се верифицираше на 30 и 60 min с TFT и на 60 min с PPT. Не бяха установени съществени промени в MBE% при HP тест (Фигура E8).



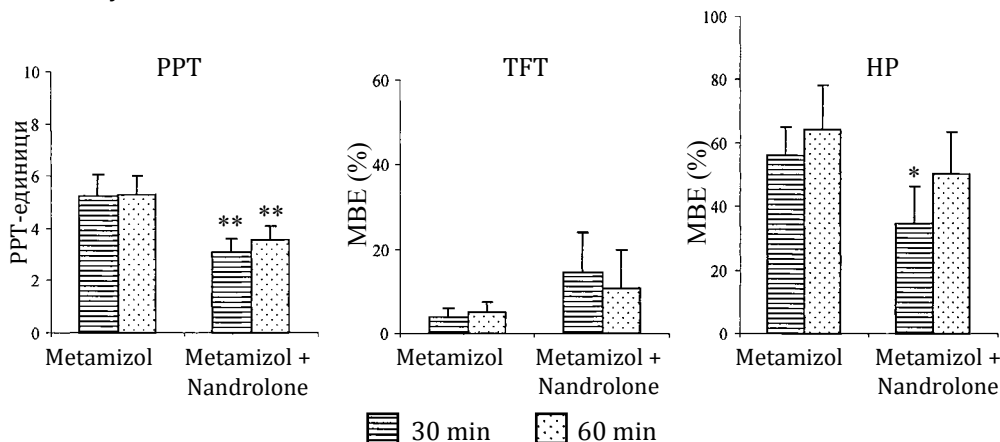
Фигура E8. Ефект на Testosterone върху аналгетичния ефект на Metamizol.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

За разлика от това третирането с Nandrolone предизвиква противоположен ефект върху аналгетичното действие на Metamizol. Установено беше, след Nandrolone аналгетичния ефект на Metamizol намалява значително. Този ефект се верифицираше на 30 и 60 min при PPT и 30 min при HP тест. Не бяха установени съществени промени в MBE% при TFT тест (Фигура E9).

Анализ на резултатите. Анализа на резултатите показва, че третирането с анаболните стероиди Testosterone и Nandrolone предизвиква разнопосочни ефекти върху аналгетичния ефект на Metamizol. Прилагането на Testosterone повишава в умерена степен аналгетичния ефект на

Metamizol (TFT, PPT). За разлика от това, прилагането на Nandrolone статистически достоверно понижава аналгетичния ефект на Metamizol (PPT). Тези данни показват, че злоупотреба с Nandrolone може да компрометира аналгезията с Metamizol. Екстраполирането на тези данни върху хора трябва обаче да бъде предпазливо, защото описаните ефекти не бяха установени с НР и TFT тестове.



Фигура Е9. Ефект на Nandrolone върху аналгетичния ефект на Metamizol.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

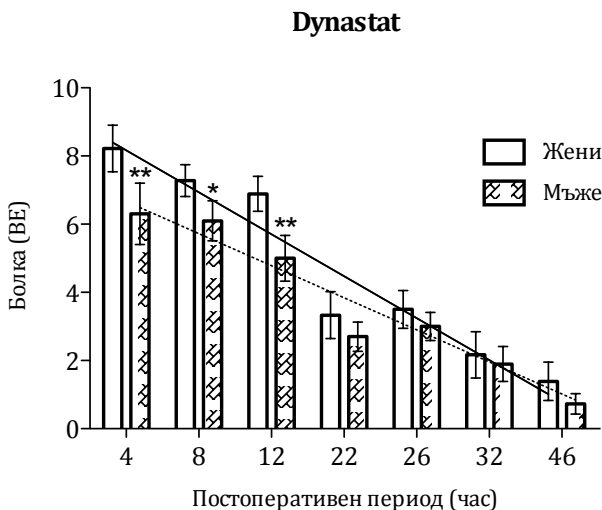
Е.4. Клинични изследвания: аналгетичен ефект на Parecoxib и Meloxicam

В изследването бяха включени 48 пациенти (22 жени и 26 мъже), които бяха разделени в две групи.

В първата група бяха включени 20 пациенти от двата пола (9 жени и 11 мъже) на средна възраст 59.85 ± 2.18 години (38 - 75 г.). Изследванията са проведени в първите 48 часа след ендопротезиране на колянна или тазобедренна става извършено под обща инхалационна анестезия. Всички пациенти в групата бяха третирани постоперативно с Parecoxib Sodium 40 mg i.v. (Dynastat, Pfizer), трикратно по схема (интраоперативно и постоперативно на 12-ти и 36-ти час).

Във втората група бяха включени 28 пациенти от двата пола (13 жени и 15 мъже) на средна възраст 24.14 ± 1.15 години (16 - 40 г.). Изследванията са проведени в първите 48 часа след артроскопски интервенции на колянна става, извършени под спинална анестезия с Lidocain Sopharma 10mg/ml (Sopharma Pharmaceuticals). Всички пациенти в групата бяха третирани трикратно постоперативно с Meloxicam 15 mg i.m. (Movalis, Boehringer Ingelheim), от 6 час след края на оперативната интервенция през 24 часов интервал.

Беше установено, че нивото на болката при пациентите от първа група (Parecoxib) е значително на 4 час след края на оперативната интервенция. При жените субективното усещане на болката беше 8.22 ± 0.68 BE. По-ниски стойности на субективно усещане на болка бяха установени при мъжете - 6.30 ± 0.9 BE. Динамиката на аналгезията показва, че субективното усещане на болка при жените остава по-високо от колкото при мъжете през първите 24 часа (Фигура E10).



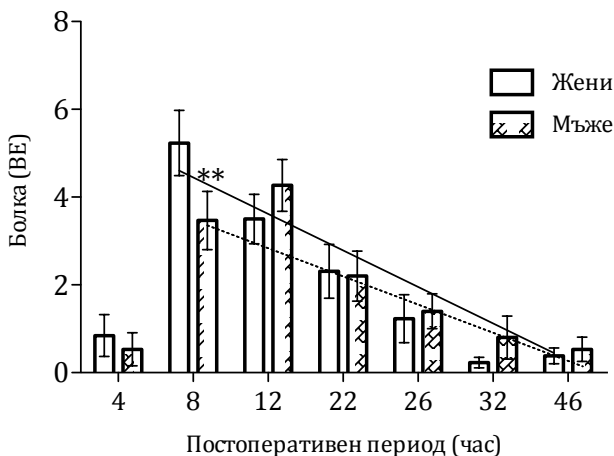
Фигура E10. Динамика на постоперативната аналгезия с Parecoxib Sodium 40 mg i.v. (Dynastat) след ендопротезиране на голяма става при мъже и жени. Промяната на интензитета на болката е представена чрез линейрен регресионен анализ. Ниво на достоверност (жени vs. мъже) * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Както показва фигурата след 24 час няма статистически значима разлика в субективното усещане на болка при мъжете и жените. Острата постоперативна болка и при двата пола на 46 час е незначителна.

Клиничното проследяване на пациентите от втора група (Meloxicam) установи, че действието на спиналната анестезия продължава до 4 ч и интензитета на болката е нисък (< 1 BE). На 8 ч след края на оперативната интервенция и мъжете и жените от тази група започват да изпитват умерена постоперативна болка. При жените субективното усещане на болката беше 5.23 ± 0.74 BE.

При мъжете от тази група също бяха установени по-ниски стойности на субективното усещане на болка - 3.46 ± 0.66 BE (Фигура E11).

Movalis



Фигура E11. Динамика на постоперативната аналгезия с Meloxicam 15 mg i.m. (Movalis) след артроскопска интервенция на колянна става при мъже и жени. Промяната на интензитета на болката е представена чрез линейрен регресионен анализ. Ниво на достоверност (жени vs. мъже) ** $p \leq 0.01$.

Динамиката на аналгезията показва, че субективното усещане на болка при жените на 8 час е по-високо от колкото при мъжете. Както

показва фигурата острата постоперативна болка и при двата пола след 32 час е незначителна.

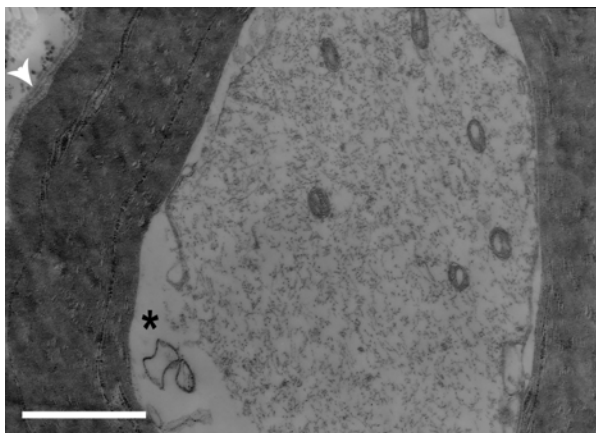
Анализ на резултатите. Данните показват, че при наличие на умерена до значителна болка, интензитета на болката при пациентите от женски пол, както в група едно (*Фигура E10*), така и в група две (*Фигура E11*) е статистически достоверно по-висок от този при пациентите от мъжки пол в съответната група.

E.5. Морфологични и фармакологични изследвания при експериментална “Neuropathia Diabetica Dolorosa”

Схема на третиране. Използвани бяха четири групи животни: контролна група, третирани с физиологичен разтвор; контролна група третирани с Streptozotocin (STZ); група STZ-третирани с Tramadol; група STZ-третирани с Amitriptyline. Експериментална STZ-индуцирана “neuropathia diabetica dolorosa” беше предизвикана по схема на третиране, както е описана в “Материали и методи”.

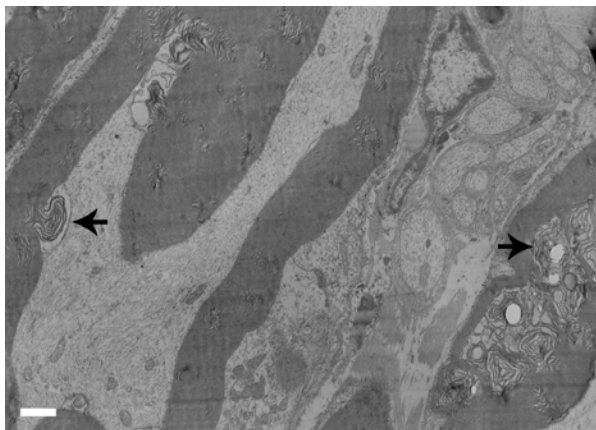
Tramadol в доза 30 mg/kg, p.o. и Amitriptyline в доза 10 mg/kg, i.p. се прилагаха на 15-тия ден след въвеждането на STZ.

Хистоморфологичните изследвания показаха, че на места аксона и аксолемата са отлепени от миелиновата обвивка (*Фигура E12*).



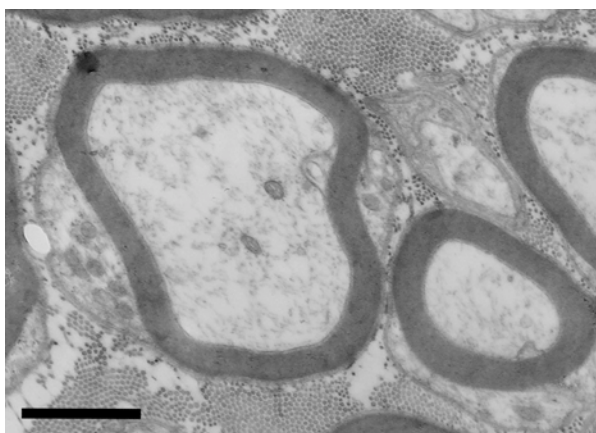
Фигура E12. Трансмисионна електронна микроскопия на срез от n.ischiadicus при STZ-индуциран диабет (20 ден)

В миелиновата обвивка се наблюдаваха деструктивни зони в нормалната ламеларната структура. Базалната ламина на Швановите клетки често беше задебелена и отпусната (*Фигура E13*).



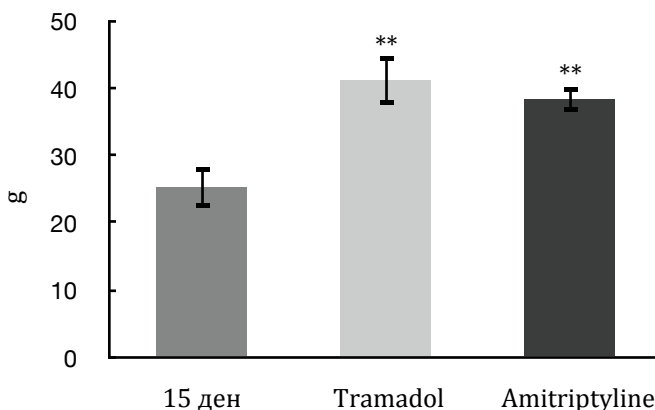
Фигура E13. Трансмисионна електронна микроскопия на срез от n.ischiadicus при STZ-индуциран диабет (20 ден)

Описаните патоморфологични изменения липсваха при нетретираната с STZ (контролна) група (*Фигура E14*).



Фигура E14. Трансмисионна електронна микроскопия на срез от n.ischiadicus (нормална находка)

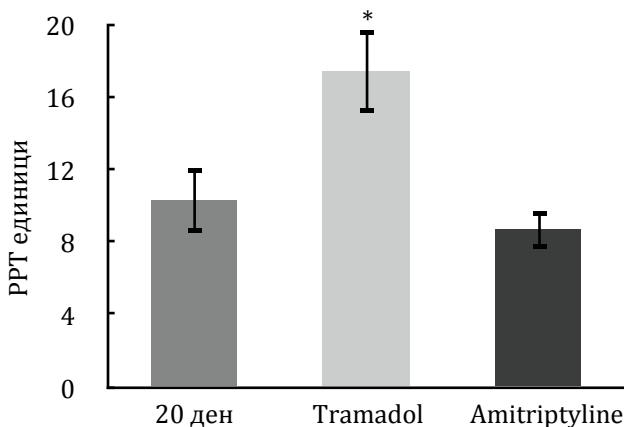
Резултатите от фармакологичните изследвания показаха, че алодиния, верифицирана чрез FHT, се проявяваше 15 дни след въвеждането на STZ. Тя се изразяваше в намаляване на ноцицептивния праг от 35.4 ± 2.0 g в контролните животни на 25.2 ± 3.0 g при STZ третирани животни. Ноцицептивните прагове на STZ-третираните животни бяха увеличени значително след прилагането на Tramadol или Amitriptyline (*Фигура E15*).



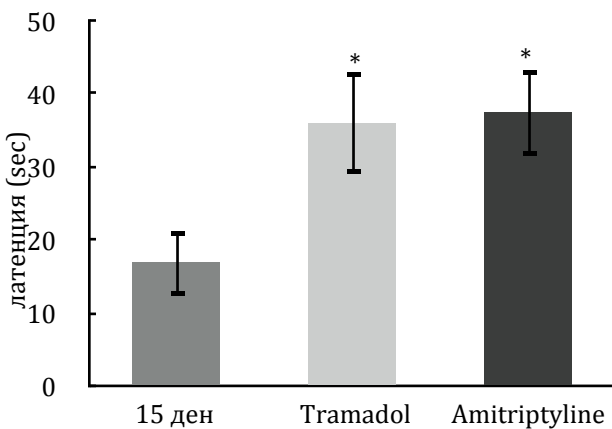
Фигура E15. Ефект на Tramadol и Amitriptyline върху механична алодиния при STZ-индуциран диабет (FHT). ** $p < 0.01$ vs. контрола

В друга серия експерименти беше показано, че механична хипералгезия, верифицирана с PPT, се проявяваше 20 дни след индукцията на STZ-диабет. Въвеждането на Tramadol увеличи значително ноцицептивните прагове, което контрастираше с липсата на аналгетичен ефект при въвеждането на Amitriptyline (*Фигура E16*).

При изследване на термична хипералгезия, верифицирана с НР тест, беше установено, че при STZ-индуциран диабет, Tramadol и Amitriptyline увеличават латентното време от 16.9 ± 4.5 sec (контролна група) на съответно 36.0 ± 7.0 sec и 37.5 ± 6.0 sec (*Фигура E17*).



Фигура E16. Ефект на Tramadol и Amitriptyline върху механична хипералгезия при STZ-индуциран диабет (PPT). * $p < 0.01$ vs. контрола



Фигура E17. Ефект на Tramadol и Amitriptyline върху термична хипералгезия при STZ-индуциран диабет (HP тест). * $p < 0.05$ vs. контрола

Анализ на резултатите. Анализа на резултатите показва, че две седмици след появата на клинични симптоми на захарен диабет (STZ-индуциран диабет) се проявява алодиния, която най-вероятно се дължи на развиваща се диабетна полиневропатия. Резултатите сочат, че при развита

диабетна невропатия, Tramadol може да бъде използван като ефикасно аналгетично средство (верифицирано чрез FHT, PPT и HP тестове). Нашите резултати показват, че Amitriptyline може да има по-ограничени клинични индикации (неефективен при механична хипералгезия, PPT).

В настоящата серия експерименти беше установена корелация между клиничните прояви на STZ-индуцирана диабетна невропатия (алодиния, хиперестезия, болка) и патологичните ултраструктурни промени на n.ischiadicus (електронна микроскопия).

Е.6. Модулиращ ефект на Benfotiamine и Thiamine върху опиоидната аналгезия и толерантност / зависимост

Схема на третиране при Morphine-аналгезия. Benfotiamine и Thiamine бяха прилагани ежедневно в дози 10, 50 или 100 mg/kg, чрез per sondam. Morphine беше прилаган по схема в дози 2.5, 5 и 10 mg/kg s.c. Ноцицептивните прагове бяха определяни с TFT и HP тестове. След 10 дневна адаптация към условията на експеримента, през която бяха извършени две контролни измервания на ноцицептивните прагове на изследваните животни, по случаен избор животните бяха разпределени в 13 групи: G1 – control (vehicle), G2 – Morphine (Mo) 2.5 mg/kg, G3 – 5 mg/kg Mo, G4 – 10 mg/kg Mo, G5 – Benfotiamine 10 mg/kg, G6 – Benfotiamine 50 mg/kg, G7 – Benfotiamine 100 mg/kg, G8 – 5 mg/kg Mo plus Benfotiamine 10 mg/kg, G9 – 5 mg/kg Mo plus Benfotiamine 50 mg/kg, G10 – 5 mg/kg Mo plus Benfotiamine 100 mg/kg, G11 – 5 mg/kg Mo plus Thiamine 10 mg/kg, G12 – 5 mg/kg Mo plus Thiamine 50 mg/kg, G13 – 5 mg/kg Mo plus Thiamine 100 mg/kg.

Схема на третиране при Morphine-толерантност/зависимост. Животните бяха изследвани с HP и TFT на 30, 60, 90 и 120 min след въвеждане на Morphine. При комбинирано третиране Morphine се прилагаше 30 min след въвеждане на Benfotiamine 10 mg/kg или Thiamine 10 mg/kg per sondam.

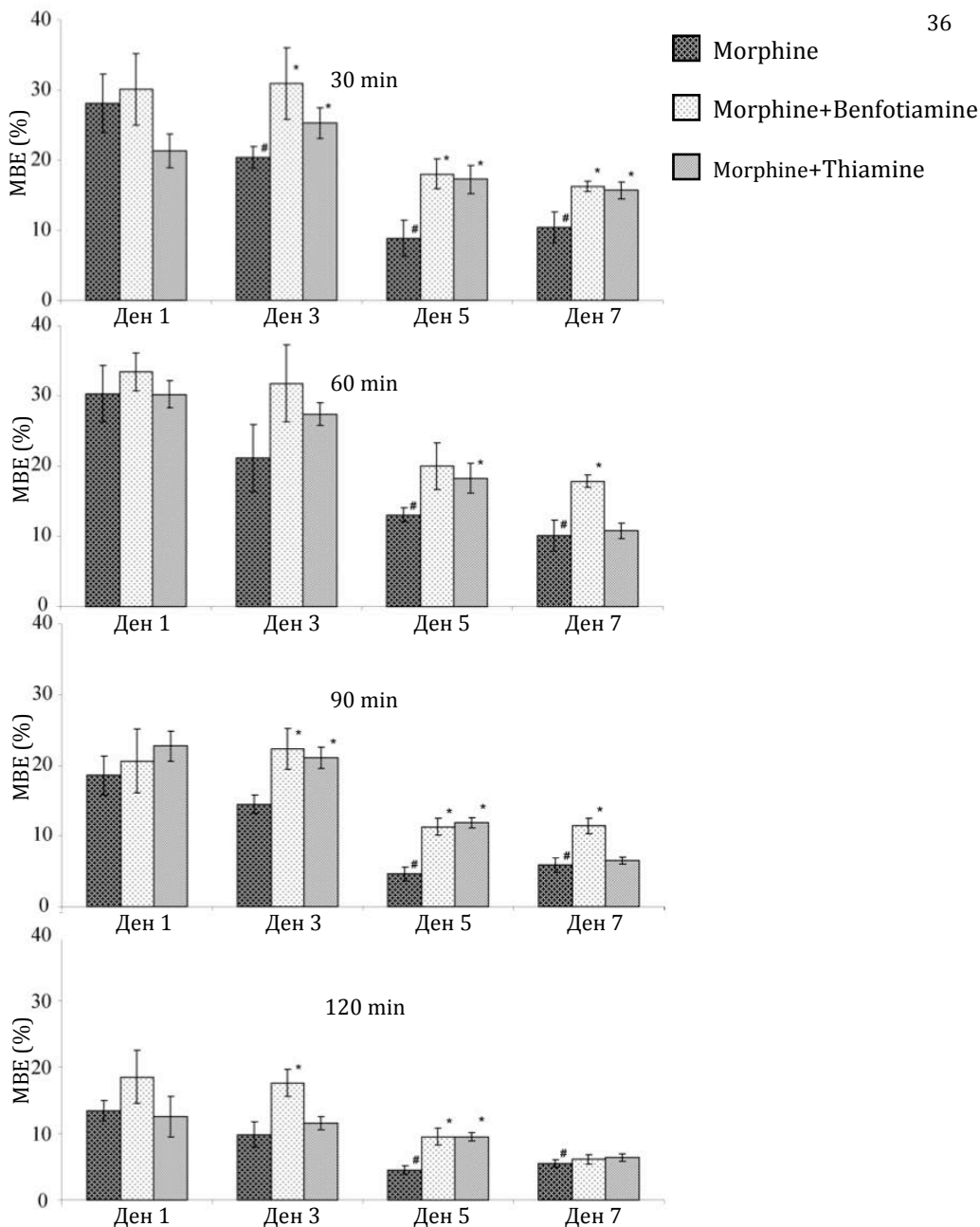
При тази схема на третиране развитието на толерантност/зависимост се установяваше на 3 - 4 ден от началото на морфиновото третиране. Животните бяха разпределени в три групи по случаен избор: G14 - Morphine (Mo), G15 - Benfotiamine plus Mo, G16 - Thiamine plus Mo.

Резултатите показаха, че базалното латентно време (време за

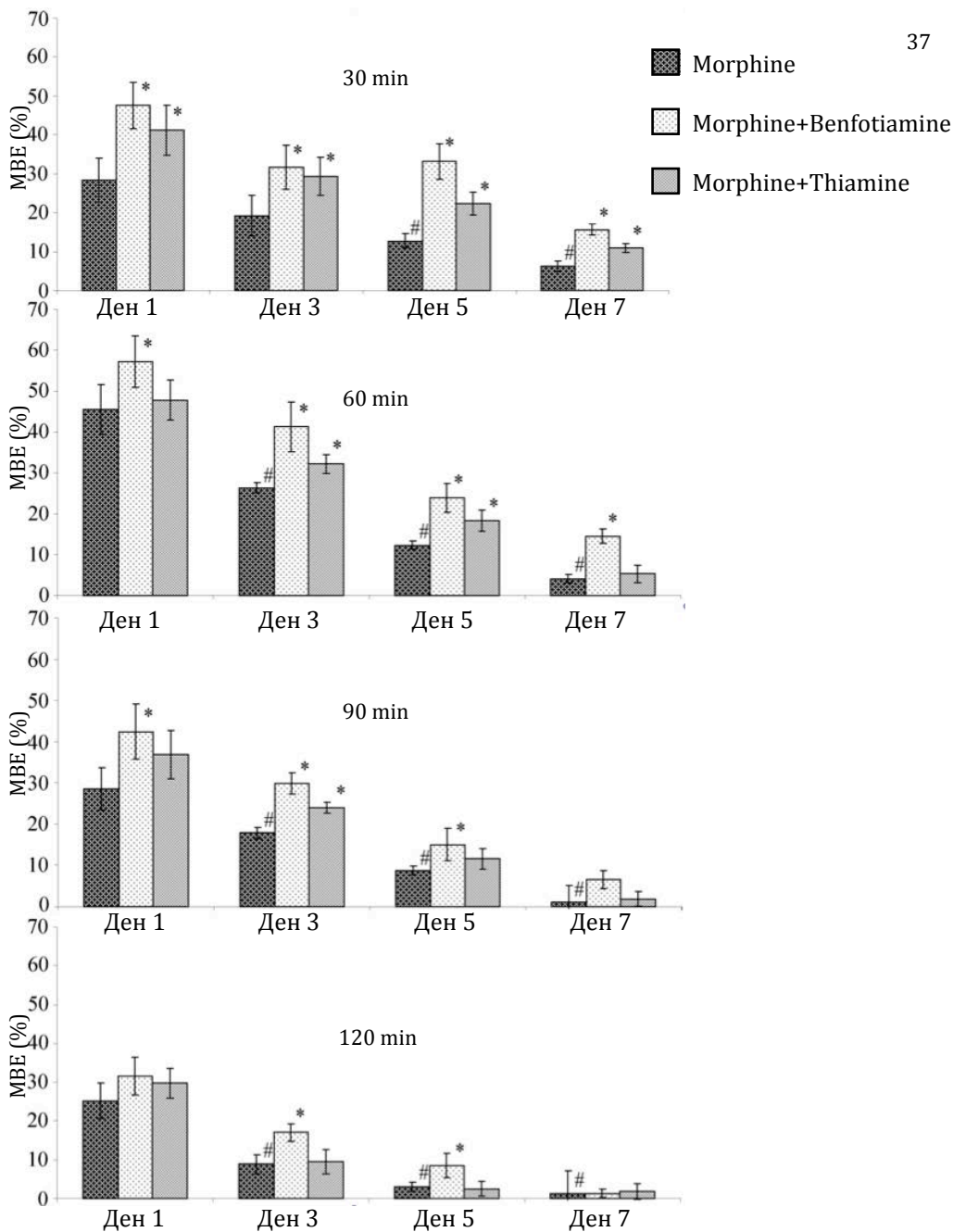
реакция) остава непроменено и не се различава в групите при всеки от двата теста. Еднократното прилагане на Benfotiamine и Thiamine 10, 50 и 100 mg/kg не промени ноцицептивния праг при TFT. При НР теста се наблюдаваше тенденция за увеличаване на базалното латентно време от Benfotiamine. Средното базално латентно време, преди инжектирането на Morphine, при TFT беше 7.18 ± 0.34 s и 6.94 ± 0.24 s при НР. Morphine показва изразен аналгетичен ефект, който значително повиши болковите прагове и при двата теста (*Фигура E18* и *Фигура E19*). Максимума на Morphine-индуцираната аналгезия настъпваше 30 - 60 min след инжектирането му, което беше установено с нарастване на латентното време или увеличаване на %МРЕ. След 90 min аналгетичния ефект на Morphine постепенно отзвучаваше. Предварителното третиране с Benfotiamine 10, 50 и 100 mg/kg не промени Morphine-индуцираната аналгезия при TFT (*Фигура E18*). За разлика от това Benfotiamine приложен в доза 10 mg/kg потенцира аналгетичния ефект на Morphine до 90 min (34% на 30 min, 31% на 90 min). Установено беше, че прилагането на по-високи дози Benfotiamine не доведе до статистически значимо увеличаване на аналгетичния ефект на Morphine. Thiamine приложен в същите дози имаше по-слаб ефект от Benfotiamine (30 min), който след 30 min не беше статистически достоверен. Беше установено, че едновременно с това Benfotiamine и Thiamine засилват чесането и психомоторната активност на животните.

При хронично третиране динамиката на морфиновата аналгезия при всяко отделно прилагане на Morphine беше сходна с тази наблюдавана при остро приложение, т.е. максималния аналгетичен ефект настъпваше 30 - 60 min след инжектирането му.

Както показват *Фигура E18* и *Фигура E19* толерантност към аналгетичното действие на Morphine се развива след приложението му в продължение на 3-4 дни. Вижда се, че максималния %МРЕ намалява от 2 до 10 пъти в периода от 1-вия до 7-мия ден на хроничното третиране. И при двата теста (TFT и НР) в групата с едновременно приложение на Morphine и Benfotiamine 10 mg/kg, аналгетичния ефект остава статистически значимо по-висок в сравнение с аналгетичния ефект в групата третирана само с Morphine.



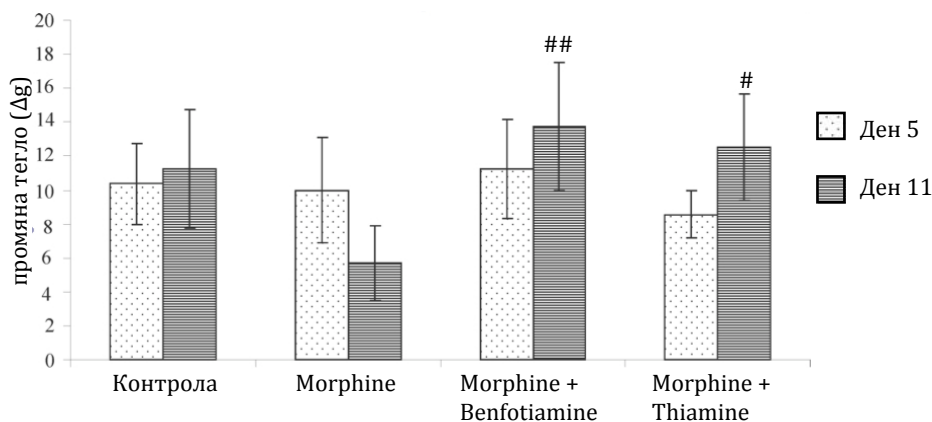
Фигура E18. Ефект на Benfotiamine и Thiamine върху морфинова аналгезия и толерантност (TFT). * $p < 0.05$ vs. Morphine от съответния ден, # $p < 0.01$ vs. Morphine 1 ден



Фигура E19. Ефект на Benfotiamine и Thiamine върху морфинова аналгезия и толерантност (HP test). * $p < 0.05$ vs. Morphine от съответния ден, # $p < 0.01$ vs. Morphine 1 ден

За разлика от динамиката в развитието на толерантност/зависимост към аналгетичния ефект на Morphine в групата третирана само с Morphine, в групите с едновременно приложение на Benfotiamine и Thiamine се наблюдаваше статистически значимо забавяне появата на толерантност/зависимост (Фигура E18 и Фигура E19). Този ефект е по-силно изразен в групата третирана с Benfotiamine в сравнение с групата третирана с Thiamine.

Благоприятен ефект от комбинираното прилагане на Morphine с Benfotiamine и Thiamine беше наблюдаван и по отношение промените на телесната маса на изследваните животни (Фигура E20).

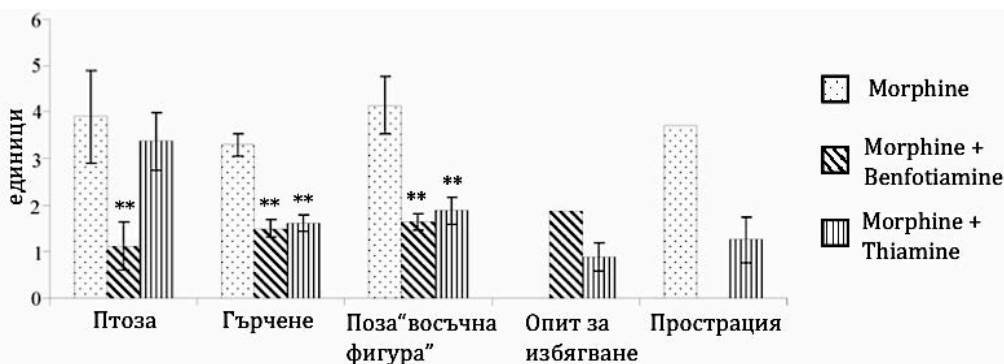


Фигура E20. Ефект на Benfotiamine и Thiamine върху промените в телесната маса при хронично третиране с Morphine

* $p < 0.05$ vs. контрола, # $p < 0.05$ vs. Morphine, ## $p < 0.01$ vs. Morphine

Фигура E20 показва, че в групата третирана с Morphine увеличението на теглото (Δg) на 11 ден е значително по-малко в сравнение с промяната на теглото в контролната група. За разлика от това в групите с едновременно приложение на Morphine с Benfotiamine или Thiamine този неблагоприятен ефект на Morphine се премахва напълно. В допълнение на това Benfotiamine и Thiamine намаляват и облекчават хиперчувствителността на кожата, както и появата на диария, наблюдавани при животните с развита зависимост към Morphine.

Naloxone 1 mg/kg приложен при силно проявена опиоидна толерантност/зависимост след 11 дневно приложение Morphine предизвика тежък абстинентен синдром. Резултатите показаха, че на 24 ч загубата на телесно тегло при Morphine-третираната група беше 17.1 ± 2.14 g. Загубата на тегло на 24 ч беше статистически значимо по-малка в групите третирани с Morphine plus Benfotiamine (11.25 ± 3.0 g) и Morphine plus Thiamine (13.75 ± 3.3 g). Значителни разлики в поведенските реакции бяха наблюдавани в отделните групи. В групата третирана с Morphine доминиращите симптоми бяха птоза, тракране със зъби, чистете, изправяне, поза “въсъчна фигура”. Всички абстинентни симптоми бяха в много голяма степен подтиснати при комбинираното третиране с Benfotiamine. Както е илюстрирано на *Фигура E21*, при животните от тази група освен това не се наблюдаваше и прострация. Паралелно с това се наблюдаваха засилване на отбранителните реакции и опитите за избягване. Прилагането на Thiamine повлия по-слабо абстинентния синдром (*Фигура E21*).



Фигура E21. Ефект на хронично третиране с Benfotiamine и Thiamine върху Morphine-абстиненция. ** $p < 0.01$ vs. Morphine

Както се вижда от фигурата степента на птоза беше сходна с тази на контролната група.

При изследваните животни абстинентния синдром представляваше комплексна проява от психични/емоционални реакции и физични/соматични симптоми (*Таблица E1*).

Таблица Е1. Физични симптоми и психични реакции при абстинентен синдром на плъх

Симптом/реакция	Точки	Максимум за 10 min
Дефекация (нормално оформени изпражнения)	1 за всеки 4	2
Саливация/лакримация	1 за всеки	2
Пилоерекция, птоза	1 за всеки с продължителност 60 sec	5
Загуба на телесна маса	1 за всеки 2.5% загуба на следващия ден	8
Диария (неоформени изпражнения)	1 за всяко	8
Поза “въсъчна фигура”	1 за всеки с продължителност 60 sec	10
Прострация	1 за всеки с продължителност 60 sec	10
Душене, чистене, ровене	1 за всеки с продължителност 30 sec	5
Тракане със зъби, дъвкане, гризане	1 за всеки с продължителност 30 sec	5
Близане на гениталии	1 за всеки с продължителност 15 sec	5
Писък при допир	1 при повтарящ се допир на всеки 120 sec	5
Агресия	1 при повтарящ се допир на всеки 120 sec	5
Опит за избягване от механично дразнене	1 за всеки 2	8
Отръскване “мокро куче”	1 за всеки с продължителност 30 sec	8
Хиперактивност, изправяне, изследователско поведение	1 за всеки с продължителност 30 sec	8
Гърчене, извиване	1 за всеки	8

Анализ на резултатите. При термично увреждане Benfotiamine за разлика от Thiamine може да потенцира аналгетичния ефект на Morphine с максимален ефект 30 до 60 min след въвеждането (верифицирано с НР). Голям терапевтичен потенциал имат данните, че хронично прилагане на Benfotiamine, много по-добре от колкото хроничното прилагане на Thiamine, забавя значително развитието на толерантност към аналгетичното действие на Morphine. Това се засилва и от наблюденията, че значителен благоприятен ефект Benfotiamine упражнява към най-тежките симптоми на абстиненция.

Получените данни дават основание да допуснем, че Benfotiamine може да бъде успешно използван при пациенти с опиоидна толерантност, зависимост и абстиненция като комплементарна терапия с добре изявен благоприятен ефект.

Е.7. Модулиращ ефект NOS-инхибитори върху опиоидната толерантност и $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake

Схема за третиране с NOS-инхибитори. След тестване на ноцицептивните прагове животните бяха разделени в 9 тестови и 1 контролна групи (всяка с 6 - 8 животни). L-Can, L-NAME, L-NoCan, L-NoCanMe се прилагаха в дози 5, 10, 15 или 20 mg/kg, i.p. самостоятелно или в комбинация с Morphine. Аналгетичния ефект на Morphine (5 mg/kg, s.c.) се определяше чрез TFT и НР тест на ден 1 (остър ефект) и на ден 6 (хроничен ефект) 30-60 min след инжектирането. Морфиновата толерантност (толерантност към аналгетичното действие) се определяше чрез ED₅₀, в края на хроничното третиране, 30 min след последната морфинова апликация. Морфиновата ED₅₀ се определяше посредством протокол на кумулативни доза отговори (Duttaroy et al. 1997). Морфинова толерантност/зависимост беше предизвикана по модифициран протокол с нарастващи дози Morphine (5 - 20 mg/kg, s.c.) прилагани двукратно в продължение на 5 последователни дни.

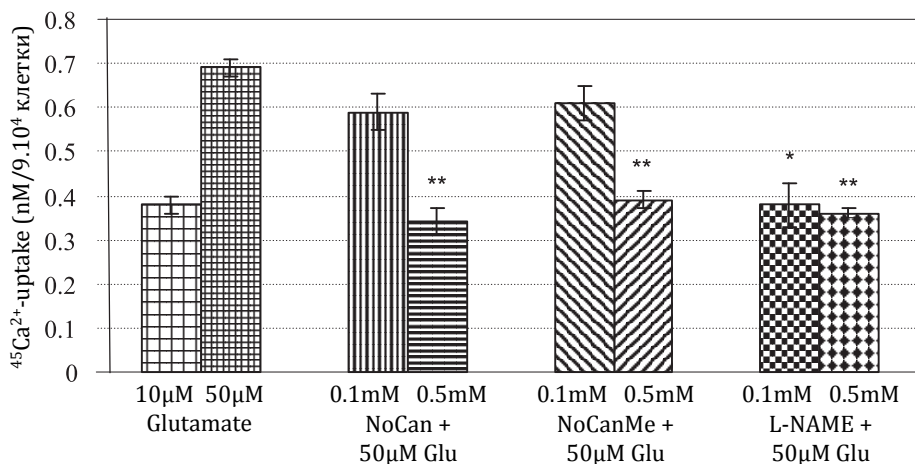
Клетъчна токсичност. Резултатите показаха, че всички изследвани субстанции не показват цитотоксично действие приложени в концентрации до 0.5 mM. Умерен цитотоксичен ефект (намалена cell viability) се наблюдаваше при прилагането на 1 mM NoCanMe. Резултатите от тези изследвания са сумирани на *Таблица Е2*.

Таблица E2. Ефект на NOS-инхибиторите върху преживяемостта на първични клетъчни култури от кортикални неврони определена с MTT тест.

Препарат	Концентрация			
	0 μM	100 μM	500 μM	1000 μM
L-NAME	0.47 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.01	0.46 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.02
L-Can	0.47 $\pm$ 0.03	0.45 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.02
NoCan	0.47 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.01	0.40 $\pm$ 0.02
NoCanMe	0.47 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.01*	0.40 $\pm$ 0.02*	0.37 $\pm$ 0.01**

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. 0 μM

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake. Резултатите от тази серия експерименти са обобщени на Фигура E22.



Фигура E22. Ефект на NOS-инхибитори върху Glutamate-индуциран $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake. * $p < 0.05$ vs. Glutamate 50 μM ; ** $p < 0.01$ vs. Glutamate 50 μM

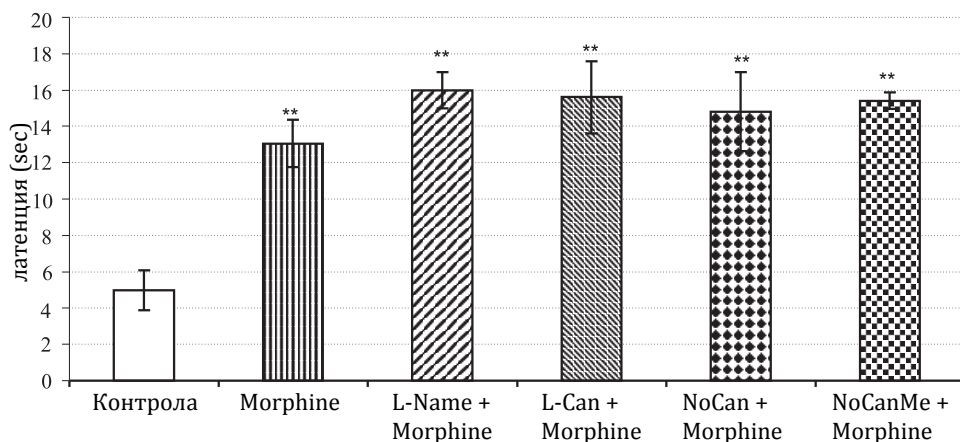
Данните показват, че Glutamate приложен в концентрации 10 μM и 50 μM предизвиква концентрация-зависимо увеличаване на интрацелуларния $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Този ефект беше антагонизиран по концентрационно-зависим начин

от МК-801 (59% инхибиция при концентрация 0.2 μM и 88% инхибиция при концентрация 2 μM). Прилагането на неспецифичния NOS-инхибитор L-NAME в концентрация 0.1 mM предизвика максимална инхибиция на индуцирания от 50 μM Glutamate $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake. За разлика от L-NAME новосинтезираните канаванинови аналози L-NoCan и L-NoCanMe показаха значително по-слаб ефект. В концентрация 0.1 mM тези антагонисти не повлияха $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake. Пет кратното повишаване на тяхната концентрация предизвика 40% намаляване на $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake. K^{+} -индуцираната деполяризация предизвика двукратно увеличаване на $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake, което се антагонизираше с 0.2 μM и 2 μM МК-801 (NMDA-инхибиция). Установено беше, че в концентрация 0.1 mM изследваните NOS-инхибитори, с изключение на L-NAME, понижават K^{+} индуцирания $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake с 34 - 44%.

Антиноцицептивен ефект. Еднократното прилагане на L-NAME или L-Can в дози 5 - 20 mg/kg, i.p. не промени болковата чувствителност. Еднократното прилагане на Morphine в доза 5 mg/kg, s.c. предизвика значителен антиноцицептивен ефект. Латентното време при TFT се увеличи от 4.9 ± 1.1 sec на 13.1 ± 1.2 sec. Комбинираното прилагане на Morphine с L-NAME или L-Can не повлия значимо неговия антиноцицептивен ефект. Латентното време на L-NAME и L-Can при TFT беше съответно 16.0 ± 1.0 sec и 14.9 ± 1.7 sec. Еднократното прилагане на новосинтезираните NOS-инхибитори в дози 5 - 20 mg/kg, i.p. също не промени болковата чувствителност при TFT и HP тест. Установено беше, че комбинираното прилагане на Morphine с L-NoCan или L-NoCanMe не повлия значимо неговия антиноцицептивен ефект. Латентното време на L-NoCan и L-NoCanMe при TFT беше съответно 14.8 ± 2.3 sec и 15.4 ± 0.5 sec.

Резултатите от тази серия експерименти са представени на *Фигура E23*. Подобни резултати бяха получени и с HP тест.

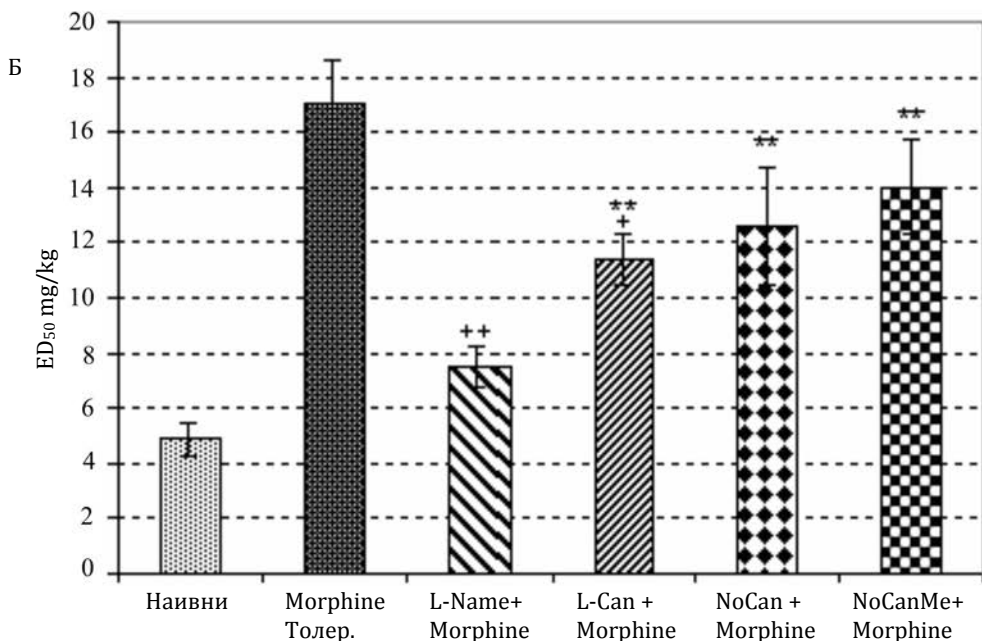
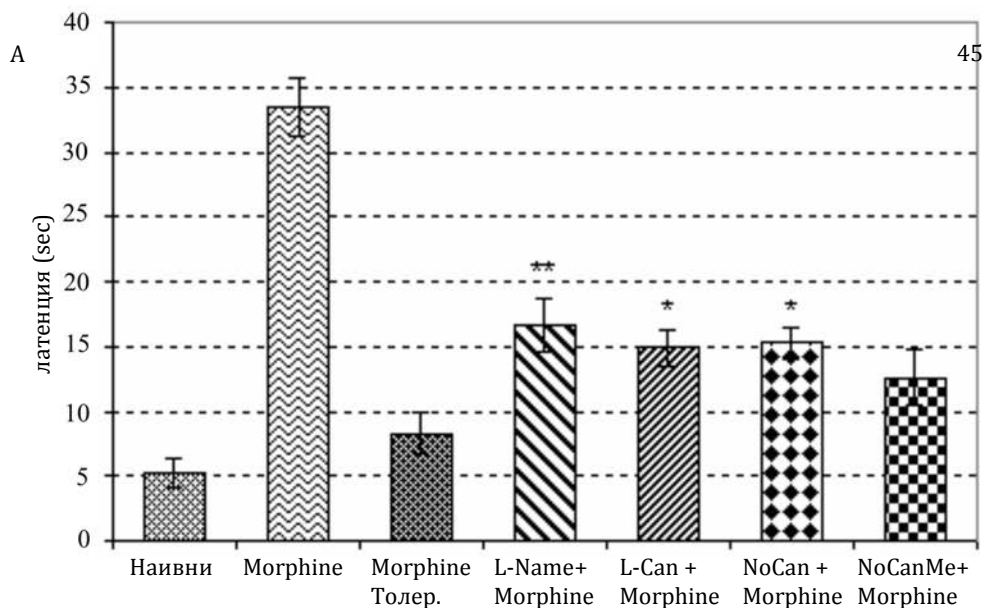
Морфинова толерантност. При 5 дневно прилагане на Morphine в доза 5 mg/kg, s.c. се прояви изразена толерантност към неговото аналгетично действие. Латентното време при HP тест нарасна от 5.2 ± 1.1 sec на 33.5 ± 2.2 sec при "наивните" животни, което контрастираше с значително скъсеното латентно време от 8.3 ± 1.6 sec при толерантните животни.



Фигура E23. Ефект на NOS-инхибитори върху морфинова антиноцицепция (TFT). ** $p < 0.01$ vs. контрола

Установено беше, че комбинираното прилагане на Morphine с изследваните NOS-инхибитори забави развитието на толерантност към неговото аналгетично действие. Латентното време при НР тест от 5.2 ± 1.1 при “наивните” животни при толерантните животни нарасна на 15.3 ± 1.2 (L-NoCan), 16.6 ± 1.6 (L-NAME) и 12.6 ± 2.1 (L-NoCanMe). Резултатите от тази серия експерименти са представени на *Фигура E24.A*.

В друга серия експерименти с TFT беше проследено влиянието на изследваните NOS-инхибитори върху ED_{50} на аналгетичния ефект на Morphine. Установено беше, че ED_{50} при “наивните” животни е 4.9 ± 0.6 mg/kg. При толерантните животни ED_{50} нарасна на 17.0 ± 1.6 mg/kg. Получените резултати показаха, че при комбинираното прилагане на Morphine с изследваните NOS-инхибитори ED_{50} на неговия аналгетичен ефект намаляваше, като ефекта беше най-изразен при L-NAME. Резултатите от тази серия експерименти са представени на *Фигура E24.B*.



Фигура E24. Ефект на NOS-инхибитори върху морфинова антиноцицепция.

А. Hot Plate тест. Латентно време на Morphine при наивни и толерантни животни.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. толерантни животни. **Б.** Tail Flick тест. ED₅₀ на аналгетичния ефект на Morphine при наивни и толерантни животни. ** $p < 0.01$ vs. наивни животни; ** $p < 0.01$ vs. толерантни животни

Анализ на резултатите. Данните показват, че при болка предизвикана от термичен стимул, новосинтезираните производни на L-Canavanine намаляват толерантността към аналгетичния ефект на Morphine в същата степен както L-NAME (HP тест). Анализът на данните от тази серия експерименти показва също, че новосинтезираните производни на L-Canavanine намаляват достоверно Glutamate-индуцирания $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake подобно на ефекта на специфичния NMDA-рецепторен антагонист MK-801. Би могло да се допусне, че ефекта на новосинтезираните производни на L-Canavanine върху толерантността към аналгетичния ефект на Morphine е резултат от модулация на NMDA-медирани NOS-зависими процеси в ЦНС.

ИЗВОДИ

1. При остра постоперативна болка Dynastat е по-ефективен при механична хипералгезия отколкото при тактилна алодиния.
2. Metamizol потенцира антиноцицептивното действие на Morphine и Dynastat.
3. Продължителното прилагане на Benfotiamine, като адювант засилва аналгетичния ефект на Parecoxib и Ibuprofen.
4. Testosterone засилва, докато Nandrolone намалява аналгетичния ефект на Metamizol.
5. В сравнение с мъжете, при жените острата постоперативна болка е по-силна и аналгетичната динамика е забавена. Това предполага аналгезия с Parecoxib и Meloxicam да бъде суплементирана с различни адюванти.
6. Структурните промени в ПНС при Neuropathia diabetica dolorosa корелират с интензитета на болковия синдром.
7. Benfotiamine/Thiamine са ефикасни адюванти при продължителна опиоидна терапия.
8. NOS-инхибиторите потискат деполяризация-предизвикания $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake и забавят развитието на толерантност към аналгетичното действие на Morphine.

ПРИНОСИ



Приноси с методологично значение

1. Разработен и валидизиран е експериментален модел на остра постоперативна болка.



Приноси с клинично значение

1. Установено е, че използваните схеми за приложение на Parecoxib и Meloxicam са удачни за постоперативно обезболяване в първите 48 часа, при пациенти от двата пола, претърпели големи, респ. малки ортопедични оперативни интервенции. Суплементацията на Parecoxib и Meloxicam с Benfotiamin може да бъде перспективен терапевтичен подход при такива пациенти.



Приноси с фундаментално значение

1. За първи път е установено е, че Benfotiamine модулира аналгетичното действие на COX-инхибитори при инфламаторна хипералгезия.
2. За първи път е показано, че Benfotiamine/Thiamine модулира аналгетичното действие на Morphine и облекчава соматичните и психични прояви на опиоидна толерантност/зависимост.
3. Установено е, че приложението на Testosterone/Nandrolon като анаболни стероиди, може да увеличи/намали аналгетичния ефект на Metamizol.
4. Установено е, че класически (L-NAME, L-Can) и новосинтезирани (NoCan, NoCanMe) NOS-инхибитори имат модулиращ ефект върху опиоидната толерантност и $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake.

Публикации свързани с дисертационния труд

1. Vlaskovska M., Takova V., Tsakova A., Surcheva S., **Kraevsky P.**, Kasakov L. (2011) Anabolic Steroids Misuse and Opioids Abstinence. Experimental Studies in Female and Male Rats. *European Neuropsychopharmacology*. (IF 3.604) Accepted 06.09.2011.
2. **Kraevsky, P.**, Kasakov, L., Vlaskovska, M. (2011) Dynamics of Parecoxib or Meloxicam Effect on Acute Postoperative Pain after Orthopaedic Surgical Interventions: Comparative Study in Hospitalized Women and Men. *Surgery, Vol LXVII, No 1, pp. 28-32.*
3. Surcheva, S., **Kraevsky, P.**, Surchev, L., Kasakov, L., Vlaskovska, M. (2008) Experimental painful diabetic neuropathy: Pharmacological and morphological approach. *Trakia Journal of Sciences, 6, pp.98-101.*
4. **Kraevsky, P.**, Surcheva, S., Yanev, N., Pajpanova, T., Kasakov, L., Vlaskovska, M. (2007) Effect of Newly Synthesized NOS Inhibitors on Morphine Tolerance and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Uptake. *Comp.rend.Acad.bulg.Sci., Vol 60, No3, pp.337-346.*
5. Surcheva, S., Tzvetkova, V., **Kraevsky, P.**, Koychev, Y., Vlaskovska, M., Kasakov, L. (2006) Benfotiamine Modulates Analgesic Effect of COX Inhibitors. Studies on Nociceptive Perception and Inflammatory Hyperalgesia. *Comp.rend.Acad.bulg.Sci. Vol 59, No12, pp.1307-1312.*
6. Yanev, N., Surcheva, S., **Kraevsky, P.**, Bovjanska, N., Surchev, L., Kasakov, L., Vlaskovska, M. (2006) Rat Model of Incisional Pain. Comparative Study of the Analgesic Effect of Metamizol (Analgin) and Dynastat. *Comp.rend.Acad.bulg.Sci. Vol 59, No12, pp.1313-1318.*
7. **Kraevsky, P.**, Surcheva, P., Tzvetkova, V., Kasakov, L., Vlaskovska, M. (2006) Effect of Benfotiamine on Morphine Analgesia and Tolerance/Dependence. Comparative Study with Thiamine. *Comp.rend.Acad.bulg.Sci., Vol 59, No12, pp.1319-1326.*
8. Philipova, Tz., **Kraevsky, P.**, Vlaskovska, M., Kasakov, L. (2004) Effect of Long-Term Administration of Sex Steroids Estradiol, Progesterone, Testosterone or Nandrolone on the Analgesic Action of Dipyrone (Metamizol, Analgin). *Comp.rend.Acad.bulg.Sci., Vol 57, No5, pp.107-114.*

Участия в научни форуми свързани с дисертационния труд

1. Vlaskovska M., Takova V., Tsakova A., Surcheva S., **Kraevsky P.**, Kasakov L. Anabolic Steroids Misuse and Opioids Abstinence. Experimental Studies in Female and Male Rats. *Sept 3-7, 2011, 24th ECNP Congress, Paris, France.*
2. Maslarov D., **Kraevsky P.**, Surcheva S., Kazakov L., Vlaskovska M. Benfotiamine модулира аналгетичната активност на нестероидните противовъзпалителни средства и опиоидите - експериментален и клиничен опит. *May 19-21, 2011, XII Congress of Neurology, Borovetz, Bulgaria.*
3. Vlaskovska, M., Surcheva, S., Maslarov, D., **Kraevsky, P.**, Kasakov, L. The Effect of Glutamate and β -AP in Cortical Primary Cultures. *March 3-7, 2008, First Joint Congress of GCNN and SSNN, Bucharest, Romania.*
4. Maslarov, D., Philipova, Tz., **Kraevsky, P.**, Vlaskovska, M., Kasakov, L. The Long-term effect of Sex Hormones on the Analgesic action of Dipyrone (metamizol). *March 3-7, 2008, First Joint Congress of GCNN, Bucharest, Romania.*
5. Nashar, M., Surcheva, S., **Kraevsky, P.**, Philipova, Tz., Bzhilova, A., Vlaskovska M., Kazakov, L. Sex Hormone Modulation of Pain and Analgesia. *Sept 13-16, 2006, 5th Congress of the European Federation of IASP, Istanbul, Turkey, European Journal of Pain – Abstracts of Pain in Europe V10, Supplement 1, Pages S88-S89. (IF 3.333)*
6. Tzvetkova, V., **Kraevsky, P.**, Vlaskovska, P., Kasakov, L. The effect of benfotiamine on the analgesic action of metamizol (analgin) and morphine. *June 3-5, 2005, 3rd National Congress of Neuroscience, Sofia, Bulgaria.*
7. Tzvetkova, V., **Kraevsky, P.**, Vlaskovska, M., Kasakov, L. Effect of Benfotiamine and Thiamine on the development of the of tolerance/dependence to morphine. *Oct 21-23, 2004, 5th National Congress of Pharmacology, Sofia, Bulgaria, P29, p83.*
8. Tzvetkova, V., **Kraevsky, P.**, Smilov, I., Vlaskovska, M., Kasakov, L. Comparative study of the effect of benfotiamine and thiamine on the development of tolerance/dependence to morphine. *June 24-26, 2004, 2nd National Conference for the Study and Treatment of Pain, Bansko, Bulgaria.*
9. **Kraevsky, P.**, Pavlova, E., Ivanova, T., Vlaskovska, M., Kasakov, L. The effect of 17-beta estradiol on kainic-acid induced seizures and 3H-glutamate

release from rat hippocampus slices: implication to opioid tolerance/dependence. 2004, *Tribuna Medica LVI, Abstract book*, p31.

10. **Kraevsky, P.**, Kasakov, L., Vlaskovska, M., On the mechanism of action of the non-opioid analgesic drug Metamizol (Analgin): use of in vitro models. Oct 24-26, 2002, *2nd National Congress of Neuroscience with International Participation, Sofia, Bulgaria, Abstracts*, p24.
11. Kasakov, L., **Kraevsky, P.**, Paipanova, T., Vlaskovska, M. Newly synthesized nitric oxide synthase inhibitors modulate morphine analgesia and ⁴⁵Ca-uptake. Aug 22-27, 1999, *9th World Congress on Pain, Vienna, Austria, Abstracts*, p534.
12. Vlaskovska, M., Simeonova, K., **Kraevsky, P.**, Kasakov, L. Tolerance to Morphine on Pain Progressing and Cardiovascular Function: Modulation by L-Arginine/Nitric Oxide Pathway. Aug 22-27, 1999, *9th World Congress on Pain, Vienna, Austria, Abstracts*, p534.
13. **Kraevsky, P.**, Georgiev, G., Altunkova, I., Krushkov, Iv., Kasakov, L., Vlaskovska, M. L-Arginin/Nitric oxide pathway modulate morphine immunosuppression. 1999, *2nd European Congress of Pharmacology, Budapest, Hungary, Fund. & Clin. Pharmacol.*, 13, Suppl. 1, 260s, PT 24. (IF 1.05)
14. Vlaskovska, M., Bobrova, I., **Kraevsky, P.**, Silbering, J., Kasakov, L., Terenius, L. Enzyme cleavage and amino acid substitution in nociceptin molecule: pharmacological characterization of newly synthesized analogues. 1999, *2nd European Congress of Pharmacology, Budapest, Hungary, Fund. & Clin. Pharmacol.*, 13, Suppl. 1, 208s, PM 67. (IF 1.05)
15. Vlaskovska, M., Surcheva, S., **Kraevsky, P.**, Krushkov, I., Kasakov, L., NOS and L-Calcium channel in a functional tandem for development of opiate tolerance and dependence. Sept 24-26, 1998, *First National Congress of Bulgarian Society for Neuroscience, Sofia, Bulgaria, Abstracts*, p44.
16. Surcheva, S., **Kraevsky, P.**, Krushkov, I., Kasakov, L., Vlaskovska, M. The interaction of NOS inhibitors and calcium channel antagonists in opiate tolerance and dependence: some pharmacological implications. July 26-31 1998, *XIII International Congress of Pharmacology, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 358, Suppl. 1, R1-366. (IF 2.68)
17. **Kraevsky, P.**, Veleva, L., Kissikov, G. Multiple choice for modulation of nociception gate. 1998, *National Students Conference, Sofia, Bulgaria, Tribuna Medica L (2)*, p11.

Summary

PAVEL T. KRAEVSKY, MD. The Modulation of Nociception and Analgesic Effects by Nonsteroidal and Steroidal Adjuvants. Neuropathic and Inflammatory Experimental Models and Clinical Studies

PhD Thesis in Pharmacology, incl. Pharmacokinetics and Chemotherapy.

Supervisor Prof. Mila Vlaskovska, MD, PhD, DSc

The treatment of nociceptive and neuropathic pain is a major problem which medicine has been challenging continuously. The intellectual and financial demands for effective pain management are rising constantly. It is known that each one of three persons in the modern industrial societies has been visiting a doctor because of acute or chronic pain. A rationale approach to optimise and individualise the management of pain is the implementation of analgesics and adjuvant supplement. Such combination could increase the analgesic effect and alleviate/retard the appearance of unwanted adverse reactions.

Aim: (i) In vivo and in vitro investigations of nociception and analgesia in experimental models of acute and chronic pain by advanced pharmacological and EM-histomorphological methods, (ii) Clinical and experimental studies of the potency of classical and new analgesic drugs in the post-operative antinociception, (iii) Pharmacological investigations of the modulation of nociception and development of tolerance/dependence by different adjuvant drugs.

Experimental Models and Methods: (i) Nociceptive and Inflammatory pain: Carrageenan hyperalgesia and Freund's adjuvant arthritis - Paw pressure test (PPT), Incapacitance test (IT), Plethysmometry. (ii) Neuropathic pain: Diabetic neuropathy and constrictive ligature of Sciatic nerve - von Frey hair test (FHT), Heath plantar test (HPT). (iii) OPIOID TOLERANCE/DEPENDENCE AND NOCICEPTION: Morphine-induced tolerance/dependence and Naloxone-precipitated withdrawal in rats - Tail-Flick test (TFT), Hot plate test (HP). (iv) In vitro methods: Histochemical investigations - Cell toxicity and stimulus evoked 45Ca^{2+} -uptake.

Clinical Methods: Evaluation of acute post-operative pain by visual analogue scale in adult female and male patients.

Statistics: GraphPad Prism 5 (Mac OSX). Were used for data processing and statistical analysis.

Principle Scientific Contributions: (i) Experimental model of acute postoperative pain in rats was developed and validated. (ii) The protocols implicated for Parecoxib or Meloxicam treatment proved suitable for post-operative analgesia throughout first 48 hours after major resp. minor orthopedic interventions in female and male adult patients.

It was found that in these patients Benfotiamine supplementation by Parecoxib and Meloxicam is a promising pain management. (iii) It was shown for the first time that in inflammatory hyperalgesia Benfotiamine modulated the analgesic action of COX-inhibitors. (iv) It was shown for the first time that Benfotiamine/Thiamine modulated the analgesic activity of Morphine and alleviated the somatic signs and psychic reactions of opioid tolerance/dependence. (v) It was found that administration of Testosterone/Nandrolone as anabolic steroids might increase or decrease the analgesic effect of Metamizol. (vi) It was found that classic (L-NAME, L-Can) as well as newly synthesized (NoCan, NoCanMe) NOS-inhibitors could modulate opioid tolerance and 45Ca^{2+} uptake.

Experiments were conducted: Laboratory of integrative and molecular mechanism of nociception and addiction, Department of Pharmacology and Toxicology, MU Sofia; Department of Neurobiology of Adaptation, BAS; Centre of Molecular Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden;

The Thesis contains 163 pages incl. 40 figures and 6 tables. The references include 388 titles. The author has published 8 papers and presented 17 communications at national, international or world congresses.

