



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ

ПОЛИНА ИВАНОВА МАТЕЕВА

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователната и научна степен „Доктор”

**БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ И МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ НА
НОВИ NOP-РЕЦЕПТОРНИ ЛИГАНДИ ВЪРХУ ГЛАДКИ
МУСКУЛИ И МОДЕЛ НА ОСТРО ПЕРИФЕРНО ВЪЗПАЛЕНИЕ**

СОФИЯ
2013 г.



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ

Директор: проф. д-р. Р. Калфин

ПОЛИНА ИВАНОВА МАТЕЕВА

**БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ И МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ НА
НОВИ NOP-РЕЦЕПТОРНИ ЛИГАНДИ ВЪРХУ ГЛАДКИ
МУСКУЛИ И МОДЕЛ НА ОСТРО ПЕРИФЕРНО ВЪЗПАЛЕНИЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”

Научна специалност:

03.01.24.- “Фармакология, вкл. фармакокинетика и химиотерапия ”

Научен ръководител:

Доц. д-р Росица Замфирова

Официални рецензенти:

Чл.-кор. проф. д-р Радомир Радомиров, д.м.н.

Проф. д-р Рени Калфин

СОФИЯ

2013 г.

Дисертационният труд се състои от 127 стандартни страници, 37 фигури, 4 таблици и една снимка. Списъкът с цитирана литература включва 283 заглавия.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на научен семинар на Института по невробиология – БАН, състоял се на 28 май 2013 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 27.08.2013 г. от 10:30 часа 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

Arg	–	аргинин
CB ₁	–	канабиноиден рецептор
CG	–	λ-карагенан
CGRP	–	калцитонин-ген-свързан пептид
CnAF	–	{1-[(метоксифосфоно)метиламино]циклоалкан карбоксилна киселина}
Dab	–	диаминобутанова киселина
Dap	–	диаминопропанова киселина
DMSO	–	диметил сулфоксид
E _{max}	–	максимален ефект
i.c.v.	–	интрацеребровентрикуларно въвеждане
i.p.	–	интраперитонеално въвеждане
i.pl.	–	интраплантарно въвеждане (подкожно в лапа)
i.t.	–	интратекално въвеждане
IUPHAR	–	Международен съюз по фармакология
LFES	–	нискочестотна електрическа стимулация
Lys	–	лизин
Nal	–	налоксон
NalBzOH	–	налоксон бензоилхидразон
N/O ₂ Q	–	ноцицептин/орфанин
NOP	–	ноцицептинов рецептор
Orn	–	орнитин
pEC ₅₀	–	отрицателен десетичен логаритъм от ефективната моларна концентрация, предизвикваща 50% от максималния ефект
Phe	–	фенилаланин
SP	–	субстанция П
TRPV1	–	ванилоиден рецептор
цАМФ	–	цикличен аденозинмонофосфат

ВЪВЕДЕНИЕ

Известно е съществуването на биологично активни пептиди в централната и в периферната нервна система. През последните години, до голяма степен се промениха представите за тяхната роля в организма. Доказано бе, че някои пептиди имат невромедиаторни и/или невромодуляторни свойства, а част от тях са колокализирани заедно с други класически невромедиатори. Установени бяха редица "несвойствени" ефекти на отдавна известни невропептиди и бяха открити нови ендогенни пептиди, чиито централни и периферни ефекти, както и механизмите на действието им все още не са напълно проучени. Това е причина тъканното разпределение на невропептидите, физиологичните и фармакологичните им отнасяния да са обект на интензивни проучвания през последните години. Подобни знания биха разкрили перспектива за разработване на нови селективни, мощни и безопасни лекарствени средства на базата на ендогенни пептиди.

В тази насока, от особен интерес са изследванията върху сравнително неотдавна открития ендогенен пептид ноцицептин (N/OFQ). Установено е, че ноцицептиновата пептидергична система е разпространена в централната и периферната нервна система – в различни участъци на главния мозък, в гръбначния мозък, в симпатикови, парасимпатикови и сетивни неврони. Специфичното разпределение на N/OFQ и ноцицептиновия рецептор (NOP) показва, че те участват в модулирането на редица биологични процеси (възприемане на болка, обучение и запаметяване, двигателна активност и др.) и функции (на сърдечно-съдовата, гастроинтестиналната, дихателната, отделителната системи и др.), контролирани от нервната система.

Съпоставянето на наличните в литературата данни, че N/OFQ потиска ефектите на активирани ванилоидни (TRPV1) рецептори, които от своя страна, в някои случаи, медираат инхибиторното действие на канабиноидите върху болката и острите възпалителни процеси, предполага съществуването на връзка в механизмите на действие на ноцицептина и канабиноидите при възпалителни процеси, с възможно участие на ванилоидните рецептори в тях. Доказването на такава връзка би имало теоретично значение и за разкриване на механизма на действие на N/OFQ при остър възпалителен процес в периферията.

Според литературните данни, ефектите на N/OFQ силно зависят от локализацията на невропептида и рецепторите му в организма, поради което механизмите, чрез които се осъществяват, могат да бъдат различни. Една от причините за ненапълно разкритите механизми на действие на ноцицептина е недостатъчният брой високоафинитетни, стабилни (в

организма) лиганди за NOP-рецепторите и в частност – практическата липса на селективни антагонисти.

“Структура-активност” проучванията в тази посока биха улеснили идентифицирането на нови молекули, които селективно да активират (агонисти) или блокират (антагонисти) NOP-рецептора, което е от голямо значение за по-пълното изясняване на ролята на N/OFQ/NOP-системата при различни физиологични и патофизиологични състояния. Освен, че дават възможност за разкриване на механизмите на действие на ноцицептина, такива високоефективни NOP-рецепторни лиганди могат да намерят практическо приложение за разработване на нови средства за експерименталната фармакология или в по-далечна перспектива – за създаване на потенциални терапевтични средства за клиничната практика на тяхна основа. Антагонистите биха били полезни при намален гастроинтестинален мотилитет, както и за подобряване на паметовите функции. Съединения с агонистична активност биха намерили приложение при лечение на невропатична болка, повишена възбудимост, опиатна зависимост, хипертония, анорексия, церебрална исхемия, астматични пристъпи, някои възпалителни процеси и др. Съобщават се данни, че NOP-рецепторни антагонисти са обещаващи и при разработването на нови антипаркинсонови лекарства (Marti et al., 2005). Поради тази причина, N/OFQ/NOP-системата продължава да предизвика неотслабващ научноизследователски интерес (Zaveri 2003).

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящата дисертация беше посредством *in vitro* и *in vivo* експериментални методики да се изследва биологичната активност и механизма на действие на 18 новосинтезирани лиганди за NOP-рецептора с различна дължина на пептидната верига, разделени в три серии:

- нови аналози на N/OFQ(1-13)NH₂, при които аминокиселини в ключови за активността позиции, са заместени с техни структурни аналози или модифицирани в N-края с {1-[(метоксифосфоно)метиламино]циклоалкан карбоксилни киселини} (CnAF)
- нови производни на хексапептида Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Lys-NH₂ (Ac-RYYRWK-NH₂), модифицирани в N-края с CnAF

За изпълнение на тази цел си поставихме следните задачи:

1. При *in vitro* условия, да се установи как се променя биологичната активност на N/OFQ(1-13)NH₂ при:

- ◆ заместване на аминокиселините Lys⁹ и/или Lys¹³ с техните структурни аналози орнитин (Orn), диаминобутанова киселина (Dab) и диаминопропанова киселина (Dap)
- ◆ заместване на аминокиселината Phe¹ с CnAF, съдържащи 5-, 7- или 8-атомен циклоалканов пръстен
- ◆ внедряване на обемен цикличен заместител (CnAF) с различна големина (5-8 атома) към аминокиселината Phe¹

2. При *in vitro* условия, да се проучи как се променя биологичната активност на NOP-активиращи хексапептиди при:

- ◆ заместване на аминокиселината Arg¹ с CnAF, съдържащи 5-, 7- или 8-атомен циклоалканов пръстен
- ◆ внедряване на цикличен заместител (CnAF) към аминокиселината Arg¹

3. При *in vivo* условия, да се изследват ефектите на N/OFQ(1-13)NH₂ и структурните му аналози [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху експериментален модел на предизвикано с λ-карагенан остро възпаление в задна лапа на плъх.

4. При *in vivo* условия, да се изясни предполагаемото участие на TRPV1-рецепторите в ефектите на N/OFQ(1-13)NH₂ и структурния му аналог [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и връзката им с канабиноидната система върху експериментален модел на предизвикано с λ-карагенан остро възпаление в задна лапа на плъх.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Проведените при разработването на дисертационния труд опити най-общо могат да бъдат разделени на две групи - експерименти *in vitro* върху изолирани гладкомускулни органи и *in vivo* – върху интактни животни.

При фармакологичните експерименти са използвани мъжки, полово зрели плъхове от порода Wistar с тегло 180-200 g, отглеждани при 22-25 °C и редуващ се 12/12-часов цикъл “светло-тъмно”, при свободен достъп до вода и храна.

Всички експерименти са проведени съгласно “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” и правилата за работа с лабораторни животни на Етичната Комисия на Институт по невробиология на БАН.

3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ПОСТАНОВКА ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ИЗОЛИРАНИ ОРГАНИ

Простатичната част от *vas deferens* на плъх е инервирана почти изцяло от адренергични неврони, притежаващи множество пресинапсно разположени хетерорецептори (Ziecher и Jaims, 1971; Wakade и Kirpekar, 1971), включително NOP-рецептори, посредством които N/OFQ може да модулира освобождаването на норадреналин (Calò et al., 1996; Nicholson et al., 1996; Nicholson et al., 1998). Това прави гладкомускулният препарат от *vas deferens* на плъх много подходящ обект за изследване на пресинапсни медиаторни взаимодействия в периферната нервна система и за целите на нашите изследвания, респективно.

3.1.1. Приготвяне на препарати от *vas deferens* на плъх

След отваряне на коремната кухина, двата семепровода (*vas deferens*) се отделят от околните тъкани, без да се разтягат. Отпрепарираниите органи се поставят в петри с разтвор на Krebs, където внимателно се почистват от остатъци на съединителна тъкан и кръвоносни съдове. За целта на нашите опити се отделя простатичната част на *vas deferens* с дължина 12 - 15 mm. Гладкомускулните препарати се монтират в силиконизирани стъклени ванички за изолирани органи с двойни стени и вместимост 4 ml, които се пълнят с разтвор на Krebs, аериран с газова смес със състав 95% O₂ и 5% CO₂. С помощта на термостат (U2) се поддържа постоянна температура на разтвора от 32.5 °C. Веки препарат се поставя в отделна ваничка по дължината на лонгитудиналните гладкомускулни слоеве, като единия му край се фиксира неподвижно, а другия се свързва с механоелектричен преобразувател за изометрично регистриране на гладкомускулни съкращения. За постигане на максимално близък до нормалното физиологично състояние тонус на гладките мускули, препаратите се обтягат с напрежение еквивалентно на тежест от 1 g и се оставят да се адаптират. Съкратителната активност на гладкомускулните препарати се регистрира и записва с онлайн система.

3.1.2. Метод на полева електрическа стимулация

Импулсното поле се създава между два платинови електрода, поставени в органните ванички на разстояние 8 cm един от друг, а електрическата стимулация се подава от цифров стимулатор. Параметрите на нискочестотната електрическа стимулация (Low-Frequency Electrical Stimulation - LFES), използвани в нашите опити с *vas*

deferens на плъх, са следните: честота 0.05 Hz, 1 ms продължителност на импулса, през интервал от 20 s., супрамаксимален волтаж.

3.1.3. Фармакологичен анализ

За изследване на биологичната активност на новосинтезираните съединения върху съкратителните отговори на гладки мускули е използван методът на van Rossum (1963) за построяване на кумулативни “доза-отговор” криви.

3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА ОСТРО ПЕРИФЕРНО ВЪЗПАЛЕНИЕ

Периферното възпаление се предизвиква чрез интраплантарно (i.pl.) инжектиране на 0.1 ml 1% разтвор на λ -карагенан (CG) в задна дясна лапа на плъх. Локалният възпалителен процес се демонстрира от зачервяване, повишаване на температурата и оток в резултат от отделянето на неврогенни и неневрогенни медиатори на възпалението (Lam and Ferrell, 1989) в мястото на приложение на CG. Тъй като увеличението на обема на лапата е времезависимо с максимум от третия до четвъртия час (Bilici et al., 2002; Costa et al., 2004), измерваният показател е промяната в обема на възпалената лапа. Обемът се отчита дигитално в ml с плетизмометър (Ugo Basile, Italy) на всеки 30 или 60 мин. след инжектирането на карагенана, до края на четвъртия час (включително). За контролен обем на лапата се приема измерената стойност преди инжектирането на карагенан. Получените след третирането стойности се сравняват с измерените контролни обеми. Промяната в обема на лапата се определя от разликата в двете стойности.

3.3. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ

Получените резултати са обработени статистически с еднофакторен анализ ANOVA (с последващ Dunnett или Newman-Keuls пост-тест, според случая) или *t*-тест на Student. Експерименталните данни са представени като средни стойности със съответните им стандартни грешки ($m \pm S.E.M.$). За статистически достоверни се приемат разликите, при които $p \leq 0.05$. При построяване на графиките е използван софтуерния продукт GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software, Inc., 1992, USA).

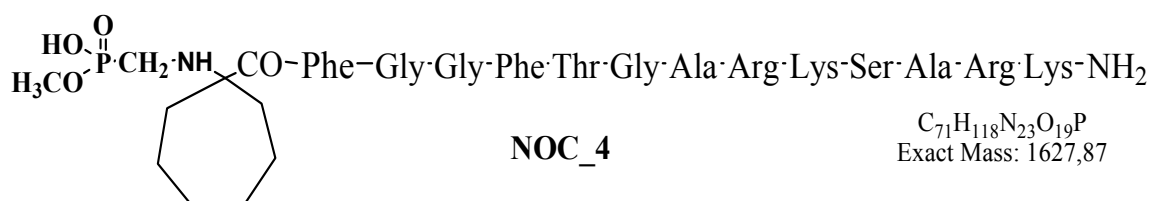
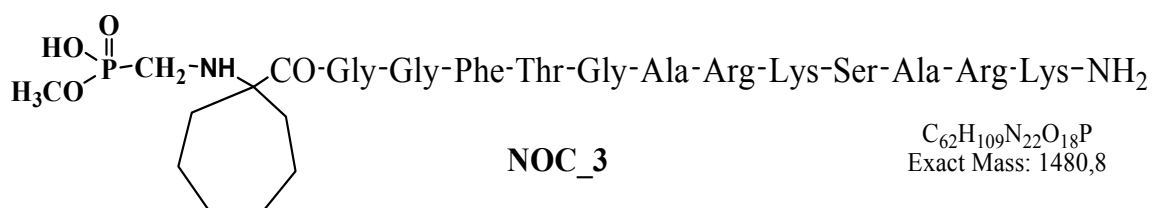
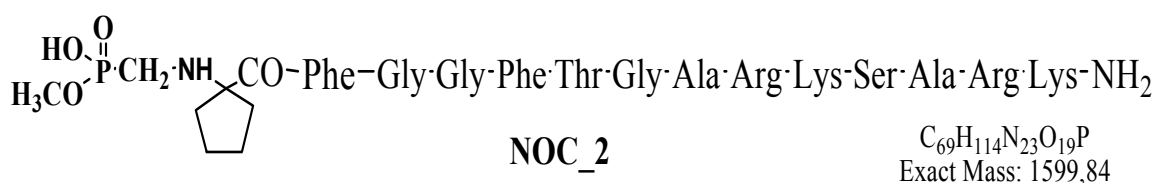
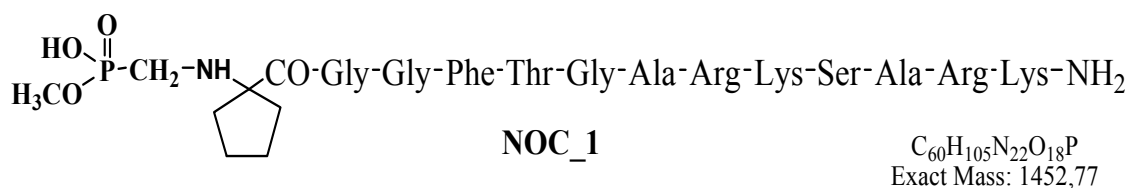
3.4. ИЗПОЛЗВАНИ ФАРМАКОЛОГИЧНИ СРЕДСТВА

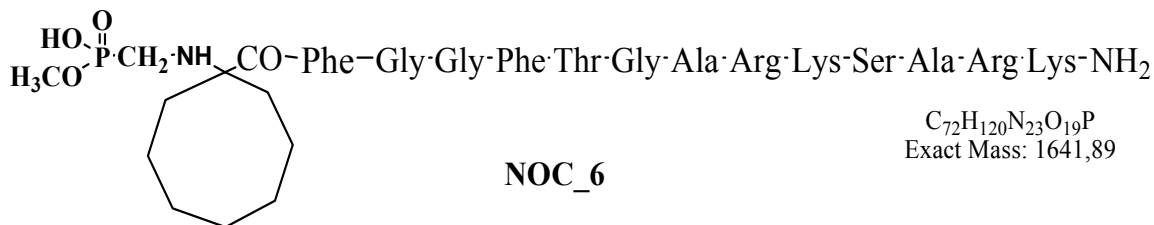
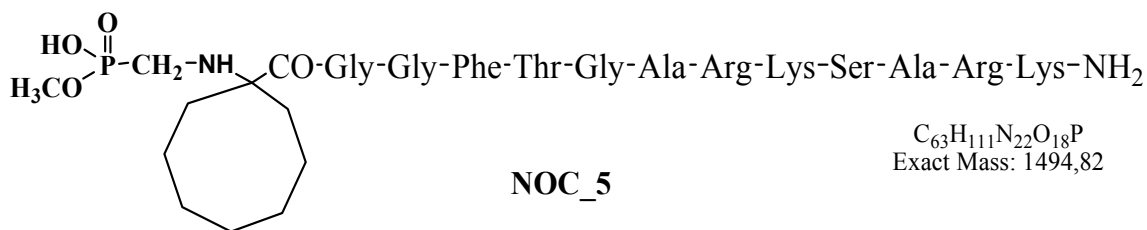
3.4.1. Фармакологични субстанции:

N/OAQ(1-13)NH₂ (Tocris); Naloxone hydrochloride (Tocris); Naloxone benzoylhydrazone (Tocris); λ-carrageenan (SIGMA-ALDRICH); Amastatin, Streptomyces sp. (Merck); Bestatin (Merck); Phosphoramidon, Disodium salt (Merck); Captopril (Merck); HU-210 - CB₁-рецепторен агонист (Tocris); AM251 - CB₁-рецепторен антагонист (Tocris); JTC-801 - NOP-рецепторен антагонист (Tocris); AA-5-HT (Arachidonyl serotonin) - TRPV1-рецепторен (ванилоиден) антагонист (Tocris); WIN 55,212-2 - смесен CB₁/CB₂-рецепторен агонист (Tocris).

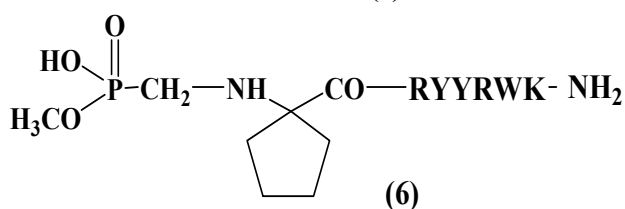
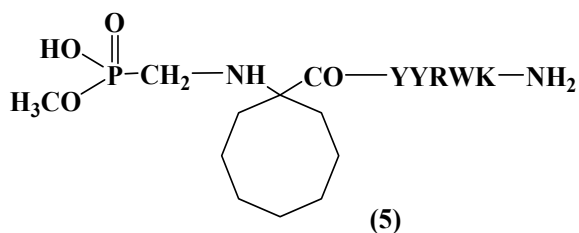
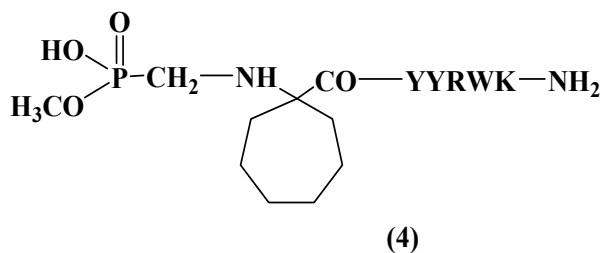
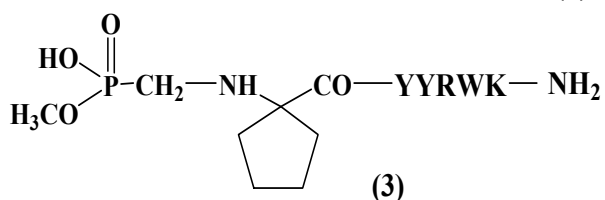
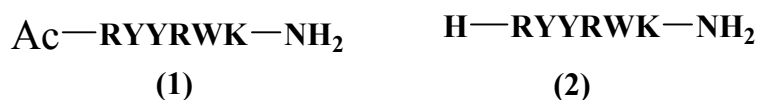
Съединения, синтезирани в Катедрата по органична химия на ХТМУ, София:

N/OAQ(1-13)NH₂; [Orn⁹]N/OAQ(1-13)NH₂; [Orn¹³]N/OAQ(1-13)NH₂; [Orn⁹,Orn¹³]N/OAQ(1-13)NH₂; [Dab⁹]N/OAQ(1-13)NH₂; [Dap⁹]N/OAQ(1-13)NH₂; [Dab⁹,Dab¹³]N/OAQ(1-13)NH₂; [Dap⁹,Dap¹³]N/OAQ(1-13)NH₂.





Аналози на Ac-RYYRWK-NH₂:



3.4.2. Разтвори и реагенти:

Дестилирана вода; Физиологичен разтвор; Разтвор на Кребс (mmol/l): NaCl – 113; KCl – 4.7; CaCl₂ – 2.5; KH₂PO₄ – 1.2; MgSO₄ – 1.2; NaHCO₃ – 25; glucose – 11.5; 0.05 M CH₃COOH; Dimethyl sulfoxide (SIGMA-ALDRICH).

IV. РЕЗУЛТАТИ

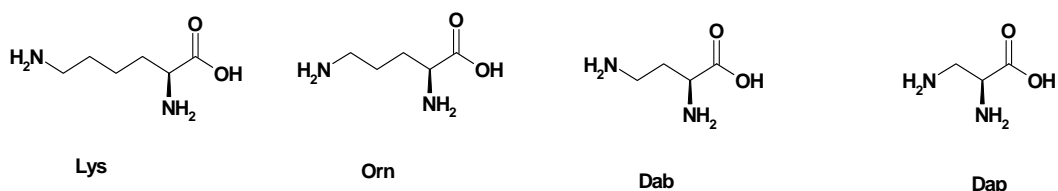
4.1. ЕКСПЕРИМЕНТИ *IN VITRO* ВЪРХУ ИЗОЛИРАНИ ГЛАДКОМУСКУЛНИ ПРЕПАРАТИ ОТ *VAS DEFERENS* НА ПЛЪХ, СТИМУЛИРАНИ С LFES

4.1.1. Изследване на биологичната активност на серия нови производни на N/OFQ(1-13)NH₂ модифицирани в девета и/или тринадесета позиция от пептидната верига

Изследвана е биологичната активност на седем производни на N/OFQ(1-13)NH₂, модифицирани в девета и/или тринадесета позиция, чрез заместване на аминокиселината Lys със структурните ѝ аналози Orn, Dab или Dap:

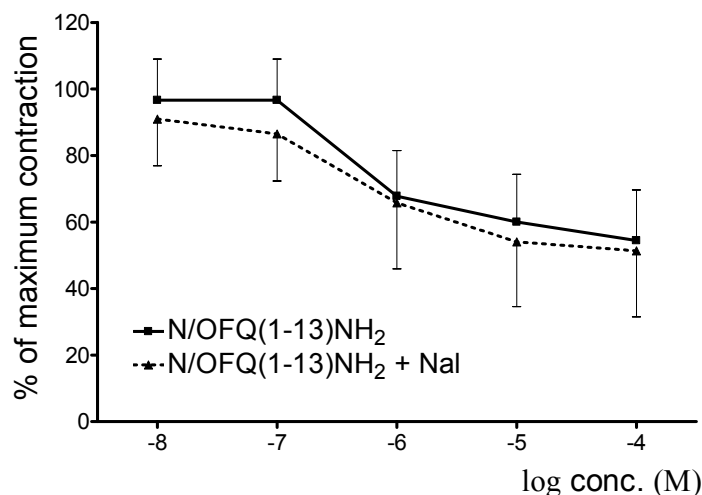
1. H-Phe¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Thr⁵-Gly⁶-Ala⁷-Arg⁸-**Orn**⁹-Ser¹⁰-Ala¹¹-Arg¹²-Lys¹³-NH₂
2. H-Phe¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Thr⁵-Gly⁶-Ala⁷-Arg⁸-Lys⁹-Ser¹⁰-Ala¹¹-Arg¹²-**Orn**¹³-NH₂
3. H-Phe¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Thr⁵-Gly⁶-Ala⁷-Arg⁸-**Orn**⁹-Ser¹⁰-Ala¹¹-Arg¹²-**Orn**¹³-NH₂
4. H-Phe¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Thr⁵-Gly⁶-Ala⁷-Arg⁸-**Dab**⁹-Ser¹⁰-Ala¹¹-Arg¹²-Lys¹³-NH₂
5. H-Phe¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Thr⁵-Gly⁶-Ala⁷-Arg⁸-**Dap**⁹-Ser¹⁰-Ala¹¹-Arg¹²-Lys¹³-NH₂
6. H-Phe¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Thr⁵-Gly⁶-Ala⁷-Arg⁸-**Dab**⁹-Ser¹⁰-Ala¹¹-Arg¹²-**Dab**¹³-NH₂
7. H-Phe¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Thr⁵-Gly⁶-Ala⁷-Arg⁸-**Dap**⁹-Ser¹⁰-Ala¹¹-Arg¹²-**Dap**¹³-NH₂

Получените по този начин пептиди се различават помежду си само по дължината на аминокиселинния остатък в девета и/или тринадесета позиция:



Една от нашите задачи беше да проследим как тези малки структурни разлики променят взаимодействието с активния център на NOP-рецептора и съответно биологичната активност.

В прилаганите от нас концентрации, новосинтезираните съединения не повлияват мускулния тонус на изолирани сегменти от *vas deferens* на плъх. Биологичната им активност е сравнявана с тази на N/OFQ(1-13)NH₂, синтезиран в същата лаборатория и използван като референтен агонист. N/OFQ(1-13)NH₂ концентрация зависимо намалява амплитудата на предизвиканите с LFES гладкомускулни съкращения на *vas deferens* от плъх, в съответствие с литературните данни (Rizzi et al., 2001). Резултатите от проведените с него експерименти са представени на Фиг. 1.



Фиг. 1. “Концентрация-отговор” крива на N/OFQ(1-13)NH₂, въвеждан преди и след Nal, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности ± SEM.

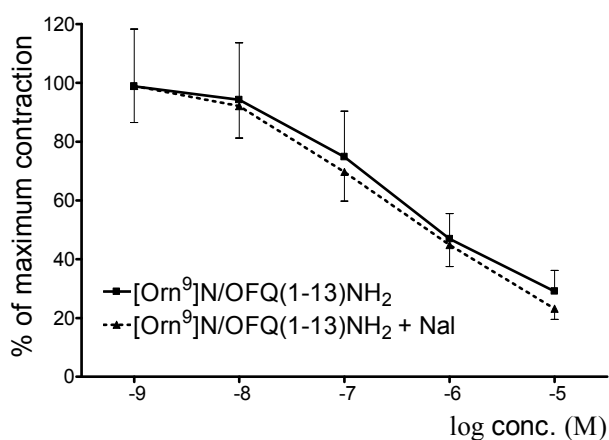
Сравняването на представените в Табл. 1 стойности за pEC₅₀ и E_{max} на различните съединения показва, че производното [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, получено след заместване на аминокиселината Lys в девета позиция с аминокиселината Orn проявява по-голяма агонистична активност от останалите аналози и по-голям максимален ефект (E_{max} = -71%, pEC₅₀ = 6.63) в сравнение с референтния агонист (E_{max} = -46%, pEC₅₀ = 6.24).

ИЗСЛЕДВАН ПЕПТИД	ПЕПТИД		НАЛОКСОН + ПЕПТИД	
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	pEC ₅₀	E _{max} (%)
N/OFQ(1-13)NH ₂	6.24±0.30	-46±15	6.40±0.36	-49±20
[Orn ⁹]N/OFQ(1-13)NH ₂	6.63±0.20	-71±7	6.67±0.12	-77±4
[Orn ¹³]N/OFQ(1-13)NH ₂	4.97±0.13	-54±5	4.97±0.18	-48±5
[Orn ⁹ ,Orn ¹³]N/OFQ(1-13)NH ₂	6.02±0.25	-56±13	5.83±0.26	-70±9
[Dab ⁹]N/OFQ(1-13)NH ₂	5.94±0.13	-76±4	5.84±0.15	-70±6
[Dap ⁹]N/OFQ(1-13)NH ₂	5.88±0.12	-65±12	5.81±0.43	-49±11
[Dab ⁹ ,Dab ¹³]N/OFQ(1-13)NH ₂	5.54±0.14	-57±11	5.53±0.13	-52±8
[Dap ⁹ ,Dap ¹³]N/OFQ(1-13)NH ₂	5.29±0.11	-47±7	5.36±0.15	-49±5

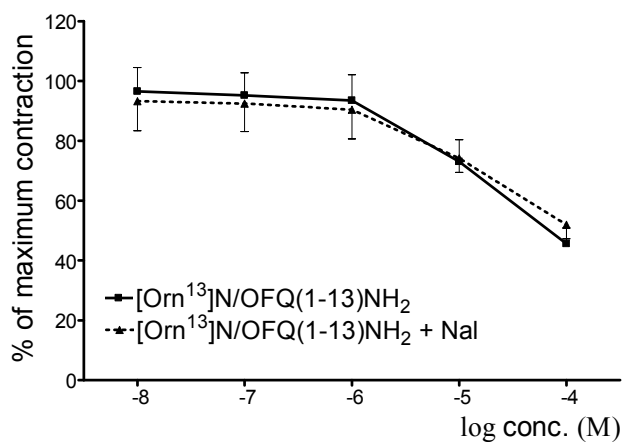
Таблица 1. Биологична активност на модифицираните в девета и/или тринадесета позиция пептидни аналози на N/OFQ(1-13)NH₂ върху предизвиканите с LFES гладкомускулни съкращения на *vas deferens* от плъх. Данните са представени като средни стойности ± SEM.

От незначителната разлика в стойностите за pEC_{50} , изчислени от кумулативните криви за $[Orn^9]N/OFQ(1-13)NH_2$ преди и след въвеждане на $1 \cdot 10^{-6}$ M Nal (Фиг. 2), се вижда, че инхибиторният му ефект се запазва непроменен и след предварително блокиране на опиоидните рецептори.

Заместването на Lys с Orn в другата важна за биологичната активност на молекулата позиция тринадесет, доведе до противоположна промяна. Полученото производно $[Orn^{13}]N/OFQ(1-13)NH_2$ показва практически липса на активност ($pEC_{50} = 4.97$) в сравнение с референтния $N/OFQ(1-13)NH_2$ ($pEC_{50} = 6.24$) при ниските концентрации и намали амплитудата на гладкомускулните съкращения само в най-високите приложени концентрации ($1 \cdot 10^{-6}$ M – $1 \cdot 10^{-4}$ M, Фиг. 3).

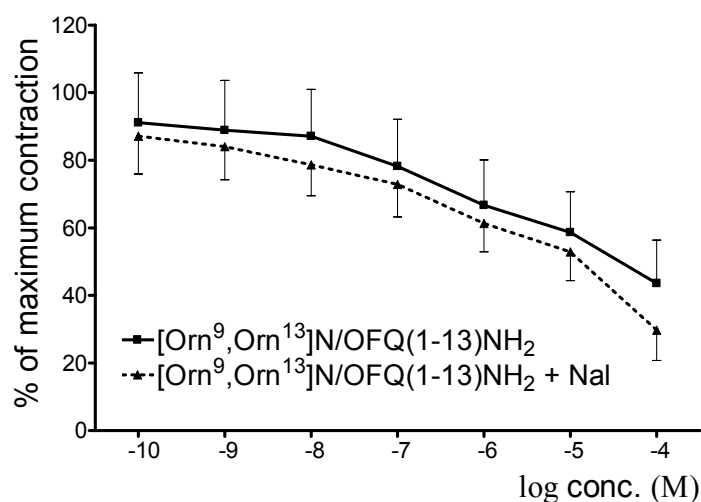


Фиг. 2. “Концентрация-отговор” крива на $[Orn^9]N/OFQ(1-13)NH_2$, въвеждан преди и след Nal, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM.



Фиг. 3. “Концентрация-отговор” крива на $[Orn^{13}]N/OFQ(1-13)NH_2$, въвеждан преди и след Nal, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM.

Едновременното заместване на Lys с Orn в двете позиции девет и тринадесет, доведе до понижаване (макар и малко по-слабо) на афинитета на полученото съединение - $[Orn^9, Orn^{13}]N/OFQ(1-13)NH_2$, в сравнение с $[Orn^9]N/OFQ(1-13)NH_2$ и с $N/OFQ(1-13)NH_2$; докато максималният му инхибиторен ефект е приблизително еднакъв с този на $[Orn^{13}]N/OFQ(1-13)NH_2$, но по-малък от този на $[Orn^9]N/OFQ(1-13)NH_2$ (Фиг. 4). Интересен е фактът, че въпреки това $[Orn^9, Orn^{13}]N/OFQ(1-13)NH_2$ понижава величината на гладкомускулните съкращения при концентрация ($1 \cdot 10^{-10}$ M) по-ниска от тази на останалите съединения.

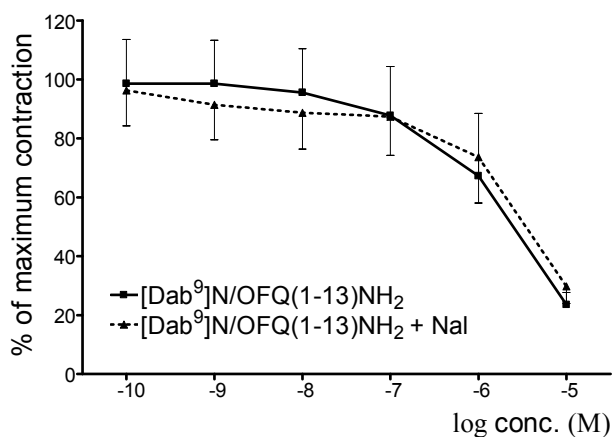


Фиг. 4. “Концентрация-отговор” крива на $[\text{Orn}^9, \text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, въвеждан преди и след Nal, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM.

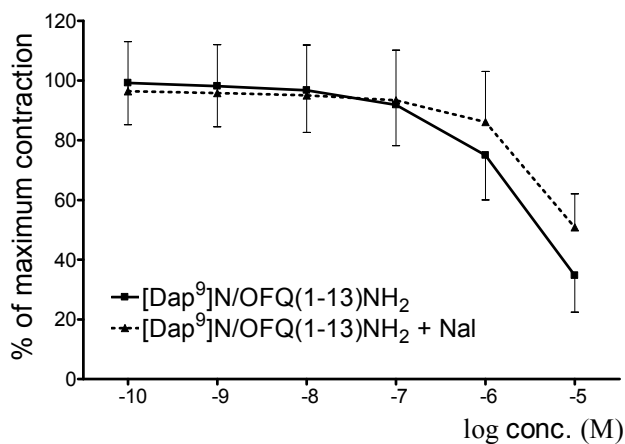
Подобно на $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, съединенията $[\text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ и $[\text{Orn}^9, \text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ също не показват съществени различия в кумулативните „концентрация-отговор” криви получени при самостоятелното им прилагане или след претретиране на сегментите от *vas deferens* с Nal ($1 \cdot 10^{-6}$ M). Следователно, регистрираното потискане на гладкомускулните съкращения най-вероятно се дължи на селективно действие върху ноцицептиновия рецептор.

Допълнителното скъсяване на страничната верига на Lys с по още една или две метиленови групи, съответно при производните $[\text{Dab}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ и $[\text{Dap}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, доведе до последващо намаляване на биологичната активност (Фиг. 5 и Фиг. 6), по-силно изразено при съединенията $[\text{Dab}^9, \text{Dab}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ и $[\text{Dap}^9, \text{Dap}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, в които Lys е заместена едновременно в двете позиции девет и тринадесет (Фиг. 7 и Фиг. 8) (подобно на заместванията с Orn⁹ и Orn⁹, Orn¹³).

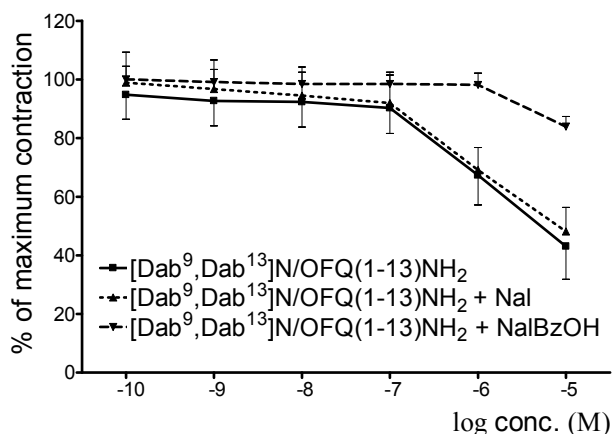
В друга серия експерименти, след едновременно блокиране на опиоидните и ноцицептиновите рецептори с $3 \cdot 10^{-5}$ M NalBzOH изследваните пептиди нямаха ефект върху съкратителните отговори на гладкомускулните препарати. Обобщаването на тези данни доказва, че ефектите на изследваните от тази серия производни на N/OFQ(1-13)NH₂, модифицирани в девета и/или тринадесета позиция, се дължат изцяло на специфично взаимодействие с NOP-рецептора (Фиг. 7 – Фиг. 8).



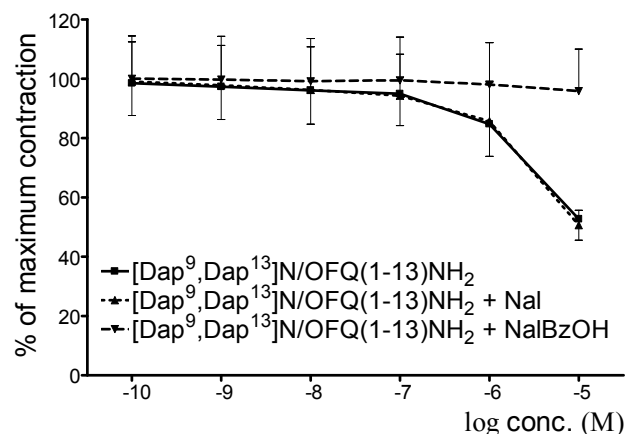
Фиг. 5. “Концентрация-отговор” крива на $[Dab^9]N/OFQ(1-13)NH_2$, въведен преди и след Nal, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM.



Фиг. 6. “Концентрация-отговор” крива на $[Dap^9]N/OFQ(1-13)NH_2$, въведен преди и след Nal, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM.



Фиг. 7. “Концентрация-отговор” крива на $[Dab^9,Dab^{13}]N/OFQ(1-13)NH_2$, въведен преди и след Nal или NalBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM.



Фиг. 8. “Концентрация-отговор” крива на $[Dap^9,Dap^{13}]N/OFQ(1-13)NH_2$, въведен преди и след Nal или NalBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM.

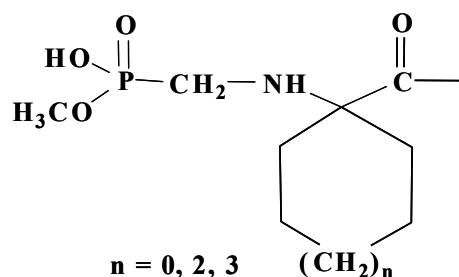
4.1.2. Изследване на биологичната активност на серия модифицирани в N-края нови производни на N/OAQ(1-13)NH₂ с аминокислотна част

Изследвани са шест модифицирани в N-края производни на N/OAQ(1-13)NH₂, условно разделени на две групи. В едната от тях - NOC_1, NOC_3 и NOC_5, аминокиселината фенилаланин (Phe) в първа позиция е заместена с {1-[(метоксифосфо)метиламино]циклоалкан карбоксилни киселини}, съдържащи 5-, 7- или 8-атомен пръстен, а в другата - NOC_2, NOC_4 и NOC_6, същите α-аминофосфонове киселини са свързани към Phe¹. Така получените нови съединения имат следната секвенция:

X-GGFTGARKSARK-NH₂ (NOC_1, NOC_3, NOC_5);

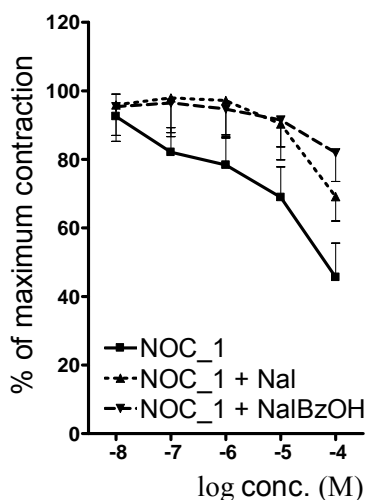
X-FGGFTGARKSARK-NH₂ (NOC_2, NOC_4, NOC_6),

където X е CnAF, съдържаща 5-, 7- или 8-атомен циклоалканов пръстен:

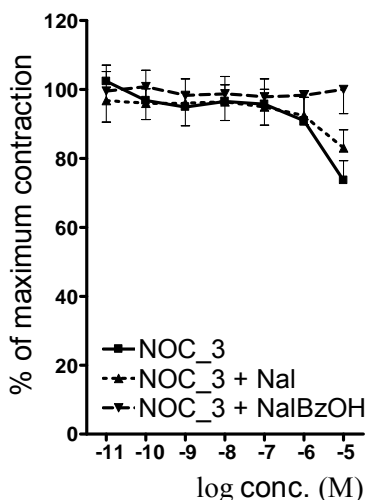


Групата производни NOC_1, NOC_3 и NOC_5, показват по-ниска агонистична активност и ефективност (pEC₅₀, E_{max}) спрямо N/OAQ(1-13)NH₂ (Табл. 2). Получените резултати за тази група аналози показват, че те инхибират предизвиканите с LFES гладкомускулни съкращения само в най-високите приложени концентрации 1.10⁻⁷ M – 1.10⁻⁵ M (Фиг. 9 – Фиг. 11).

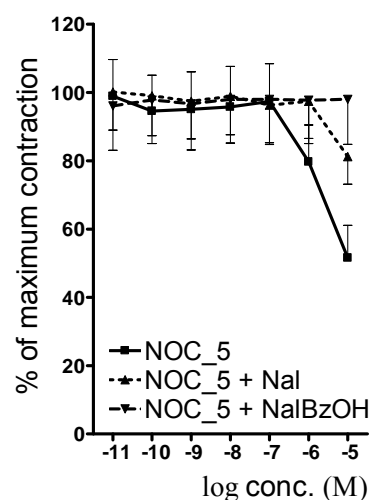
След блокиране на класическите опиоидни рецептори с Nal (1.10⁻⁶ M), съединенията от тази група (NOC_1, NOC_3 и NOC_5) инхибират значително по-слабо съкращенията на гладкомускулните препарати, а в присъствие на NalBzOH (3.10⁻⁵ M) изобщо не проявяват инхибиторно си действие. Тези данни свидетелстват за възникване на опиоидоподобна активност при заместване на Phe в първа позиция от пептидната верига на N/OAQ(1-13)NH₂ с CnAF. Не се установява отчетлива закономерност между уголемяването на цикъла в заместителя и промяната на биологичната активност.



Фиг. 9. “Концентрация-отговор” крива на NOC_1, въвеждан преди и след Nal или NalBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM.



Фиг. 10. “Концентрация-отговор” крива на NOC_3, въвеждан преди и след Nal или NalBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM.

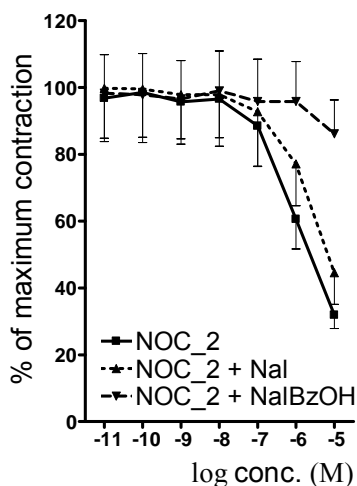


Фиг. 11. “Концентрация-отговор” крива на NOC_5, въвеждан преди и след Nal или NalBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM.

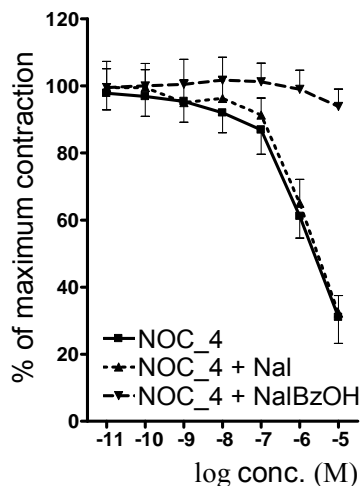
Съединенията от другата група, в която SnAF са свързани към Phe¹ – NOC_2, NOC_4 и NOC_6, проявяват добре изразена агонистична активност ($pEC_{50} = 6.17 - 6.51$), с максимален ефект ($E_{max} = -68\% - -90\%$), много по-голям от този при предходната група (NOC_1, NOC_3 и NOC_5) и близък до този на N/OAQ(1-13)NH₂ (Табл. 2).

Изненадващ се оказа фактът, че съединение NOC_6, което съдържа най-голям циклоалканов пръстен (8-атомен) в аминоксидния заместител, достига същия по стойност максимален ефект, какъвто получаваме за N/OAQ(1-13)NH₂, но при 10 пъти по-висока концентрация (Фиг. 14). Получените резултати за другите две съединения от тази група, NOC_2 и NOC_4, не показват зависимост между активността им и различната големина на пръстена (5 или 7 атома) в заместителя (Фиг. 12, Фиг. 13).

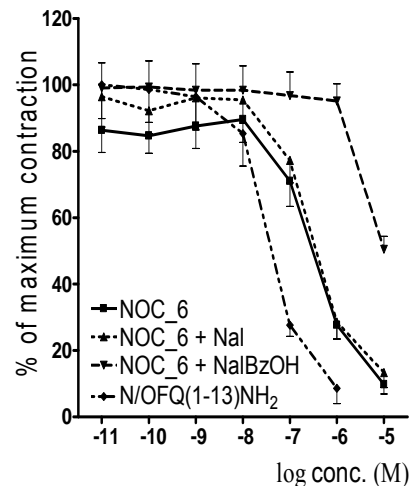
Не се наблюдават съществени разлики в инхибиторните ефекти на съединенията от тази група, когато са прилагани самостоятелно или след преинкубиране на гладкомускулните препарати с опиоидния блокатор Nal ($1 \cdot 10^{-6}$ M) (Фиг. 12 – Фиг. 14). Заедно с това, отсъствието на ефектите след прилагане на $3 \cdot 10^{-5}$ M NalBzOH (за блокиране и на двата типа рецептори - класически опиоидни и NOP) е доказателство за селективно взаимодействие на NOC_2, NOC_4 и NOC_6 с NOP-рецепторите.



Фиг. 12. “Концентрация-отговор” крива на NOC_2, въвеждан преди и след Nal или NalBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM.



Фиг. 13. “Концентрация-отговор” крива на NOC_4, въвеждан преди и след Nal или NalBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM.



Фиг. 14. “Концентрация-отговор” крива на NOC_6, въвеждан преди и след Nal или NalBzOH, върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM.

ИЗСЛЕДВАН ПЕПТИД	ПЕПТИД		НАЛОКСОН + ПЕПТИД	
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	pEC ₅₀	E _{max} (%)
N/OAQ(1-13)NH ₂	7.41 \pm 0.11	-85 \pm 2	7.18 \pm 0.13	-86 \pm 3
NOC_1	5.37 \pm 0.31	-54 \pm 10	4.85 \pm 0.72	-31 \pm 7
NOC_2	6.17 \pm 0.12	-68 \pm 4	5.92 \pm 0.08	-55 \pm 9
NOC_3	6.28 \pm 0.33	-26 \pm 6	5.83 \pm 0.36	-17 \pm 5
NOC_4	6.16 \pm 0.13	-69 \pm 8	6.06 \pm 0.06	-68 \pm 5
NOC_5	5.92 \pm 0.17	-48 \pm 10	5.74 \pm 0.72	-19 \pm 8
NOC_6	6.51 \pm 0.15	-90 \pm 3	6.55 \pm 0.10	-87 \pm 5

Таблица 2. Биологична активност на модифицираните в първа позиция новосинтезирани пептидни аналози на N/OAQ(1-13)NH₂ върху предизвиканите с LFES съкращения на *vas deferens* от плъх. Данните са представени като средни стойности \pm SEM.

4.1.3. Изследване на биологичната активност на серия модифицирани в N-края нови аналози на хексапептида Ac-RYYRWK-NH₂ с аминоксфонатна част

В изпълнение на втората поставена задача е изследвана биологичната активност на пет модифицирани в N-края производни на Ac-RYYRWK-NH₂ (съединение 1), използван като базисна структура (Табл. 3). Три от тях са получени чрез заместване на Arg в първа позиция от пептидната верига със същите CnAF (съдържащи 5-, 7- или 8-атомен пръстен), използвани при предходната разгледана група съединения. Получените по този начин нови производни (съединения 3, 4 и 5) имат следната секвенция:



където X е CnAF, съдържаща 5-, 7- или 8-атомен циклоалканов пръстен.

Съединение 6 е хептапептидно производно на Ac-RYYRWK-NH₂, в което α -аминоксфоновата карбоксилна киселина с 5 атомен циклоалканов пръстен е свързана към Arg¹, а съединение 2 е със свободен, неацетилян аминокрай (Табл. 3).

Изследваните съединения са въвеждани кумулативно в концентрации $1 \cdot 10^{-11}$ M – $1 \cdot 10^{-5}$ M. Ефектите на съединенията 2 – 6 са сравнявани с Ac-RYYRWK-NH₂ (високоактивен и селективен парциален агонист (Dooley et al., 1977)), който е синтезиран в същата лаборатория и използван като референтно съединение. Получените от нас данни за биологичната му активност ($pEC_{50} = 8.95$; $E_{max} = -40\%$) са близки до литературните ($pEC_{50} = 9.1$; $E_{max} = -66\%$), получени от Но и сътр. (2000).

От сравняването на кумулативните „концентрация-отговор“ криви за ефектите на референта и съединение 6 се вижда, че след заместване на ацетиловата група с CnAF с 5-атомен циклоалканов пръстен (Фиг. 15) се наблюдава редуциране на агонистичната активност ($pEC_{50} = 5.08$). Въпреки това, действието на хептапептида остава специфично за NOP-рецептора, тъй като не се наблюдава разлика между кумулативните криви в присъствие или отсъствие на NaI ($1 \cdot 10^{-6}$ M) и инхибиторният ефект на хептапептида не се проявява изобщо след едновременното блокиране на ноцицептиновите, и на класическите опиоидни рецептори с NaIBzOH ($3 \cdot 10^{-5}$ M). Тези резултати не са показани графично, защото поради регистрираната тахифилаксия всички кумулативни криви са получени на отделни гладкомускулни препарати.

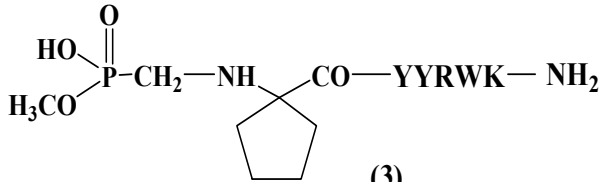
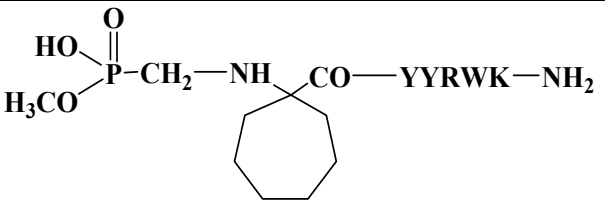
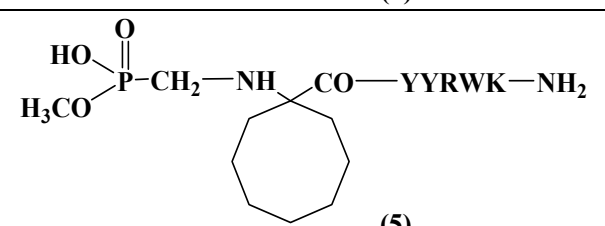
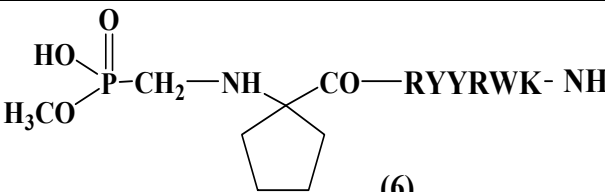
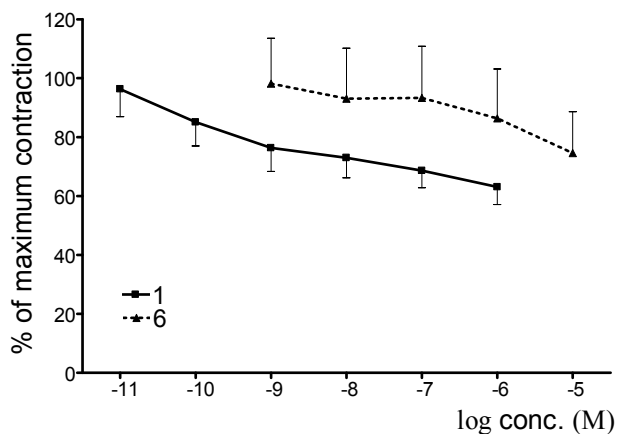
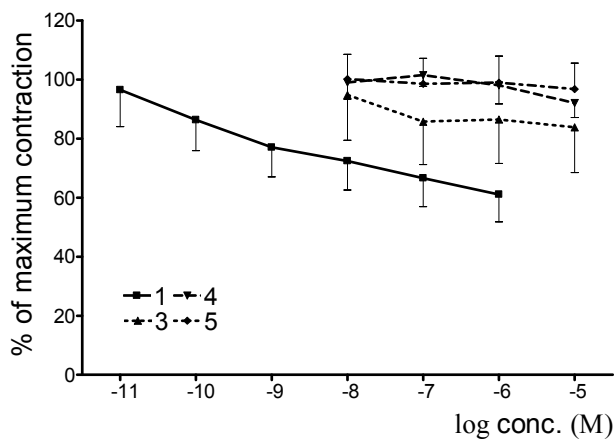
ИЗСЛЕДВАНО СЪЕДИНЕНИЕ	САМОСТОЯТЕЛНО ПРИЛОЖЕНО		СЪЕДИНЕНИЕ + НАЛОКСОН	
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	pEC ₅₀	E _{max} (%)
Ac—RYRWK—NH ₂ (1)	8.95	-40.0	9.38	-44.7
H—RYRWK—NH ₂ (2)	4.84	-25.0	4.94	-7.7
 (3)	5.82	-16.2	4.83	-7.67
 (4)	4.81	-7.4	4.87	-9.44
 (5)	4.78	-3.25	4.83	-5.63
 (6)	5.08	-25.6	5.19	-23.5

Таблица 3. Биологична активност на новосинтезираните производни на Ac-RYRWK-NH₂, модифицирани в първа позиция, върху предизвиканите с LFES съкращения на *vas deferens* от плъх. Данните са представени като средни стойности.

На Фиг. 16 са сравнени кумулативните криви на референта и съединенията (3, 4 и 5), в които Arg¹ е заместена с CnAF. Графиката показва, че в относително ниски концентрации (1.10⁻⁸ М – 1.10⁻⁷ М), съединение 3 умерено потиска предизвиканите с LFES съкращения на *vas deferens*, в сравнение със съединение 1.



Фиг. 15. “Концентрация-отговор” крива на референта (Ac-RYYRWK-NH₂) (1) и хептапептида (съединение 6) върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности ± SEM.



Фиг. 16. “Концентрация-отговор” крива на референта (Ac-RYYRWK-NH₂) (1) и хексапептидните аналози (3-5) върху гладкомускулните съкращения на *vas deferens* от плъх, предизвикани с LFES. Резултатите са представени като средни стойности ± SEM.

Трябва да се отбележи, че след блокиране на класическите опиоидни рецептори с Nal ($1 \cdot 10^{-6}$ M), инхибиторните му ефекти не се проявяват и стойността $pEC_{50} = 4.83$ става много близка до тази след NalBzOH - $pEC_{50} = 5.0$. Следователно, може да се предположи, че това съединение (3) инхибира гладкомускулните съкращения не вследствие на взаимодействие с ноцицептиновия рецептор, а с класическите опиоидни рецептори и вероятно е техен агонист. При съединения 4 и 5, уголемяването на цикъла корелира с намаляване на стойностите за pEC_{50} и E_{max} . Може да се каже, че тези две съединения не повлияват амплитудата на гладкомускулните съкращения (Фиг. 16).

4.2. ЕКСПЕРИМЕНТИ *IN VIVO* ВЪРХУ МОДЕЛ НА ОСТРО ПЕРИФЕРНО ВЪЗПАЛЕНИЕ

4.2.1. Изследване на ефектите на N/OFQ(1-13)NH₂ и структурните му аналози [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху предизвикано с λ-карагенан възпаление

За да изясним механизма на действие на N/OFQ *in vivo* нашата експериментална работа продължи с изследване и сравняване на ефектите на N/OFQ(1-13)NH₂ и структурните му аналози [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, и [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ (показали най-голяма ефективност при опитите върху гладки мускули) върху експериментален модел на предизвикано с CG остро, периферно възпаление в задна дясна лапа на плъх.

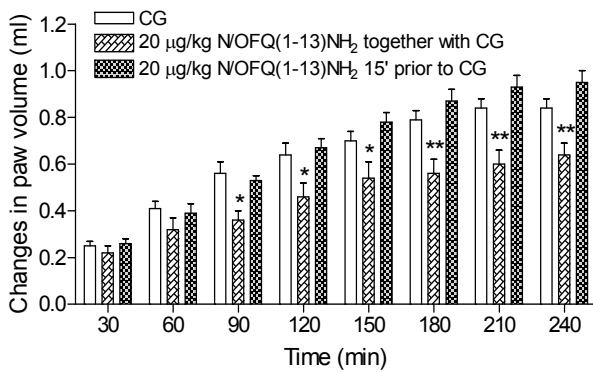
Изследванията са проведени по две експериментални схеми. При едната, изследваното съединение се въвежда 15 мин. преди CG, за да се проучи възможен протективен ефект, а при другата – изследваният пептид се въвежда едновременно с CG.

Въвеждането на N/OFQ(1-13)NH₂ в доза 20 µg/kg (i.p.) едновременно с CG потиска статистически достоверно развитието на отока още на 90-тата минута от началото на опита. Този инхибиторен ефект е добре изразен, както спрямо третираната само с CG група животни, така и спрямо групата, в която N/OFQ(1-13)NH₂ е инжектиран 15 мин. преди CG (Фиг. 17). В края на четвъртия час, големината на отока на възпалените лапи на третираната с N/OFQ(1-13)NH₂/CG (при едновременно въвеждане) група животни е подчертано по-малка, в сравнение с тази, третирана само с CG. Общо, динамиката на развитие на отока е еднаква за двете групи: третирани едновременно с N/OFQ(1-13)NH₂/CG или само с CG.

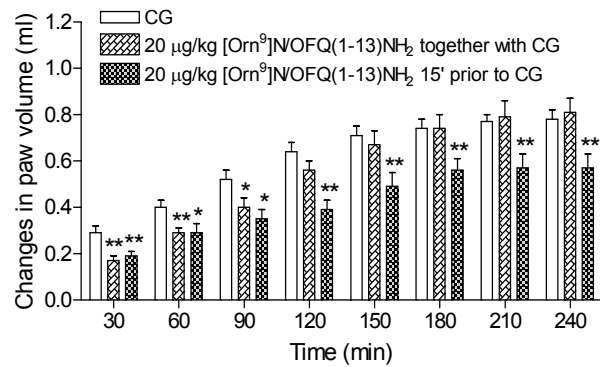
Инжектиран i.p. 15 мин. преди CG, обаче, N/OFQ(1-13)NH₂ (в същата доза 20 µg/kg) не потиска образуването на оток. Противоположно на това, дори се наблюдава тенденция към увеличаване на едема на възпалените лапи след 150-та минута, спрямо контролната група животни (третирани само с CG).

Второто изследвано съединение в доза 20 µg/kg, [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, потиска забележимо и статистически достоверно възпалителния процес още в самото начало на развитието му (от 30-та до 90-та минута), в приблизително еднаква степен, независимо дали е въведено 15 мин. преди CG или едновременно с него (Фиг. 18). След 120-та минута до края на експеримента, отокът на лапите в групата, третирана с [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ 15 мин. преди CG, остава значително и статистически достоверно по-малък в сравнение с контролната група (третирана само с CG). При инжектираната едновременно с [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂/CG група

животни, обаче, измерваните стойности за обема на лапата не се отличават от контролните (Фиг. 18).



Фиг. 17. Ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ върху предизвикано с CG остро възпаление: обемът на лапата е измерван на всеки 30 минути (за период от 4 часа) след инжектиране на CG, приет за начален момент. Данните са представени като средни стойности ± SEM от 7 - 9 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG, се приемат разлики, при които *p<0.05; **p<0.01.



Фиг. 18. Ефекти на [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху предизвикано с CG остро възпаление: обемът на лапата е измерван на всеки 30 минути (за период от 4 часа) след инжектиране на CG, приет за начален момент. Данните са представени като средни стойности ± SEM от 7 - 9 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG, се приемат разлики, при които *p<0.05; **p<0.01.

4.2.2. Проучване на връзката в механизма на действие на N/OFQ(1-13)NH₂, структурния му аналог [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и канабиноидите върху предизвикано с λ-карагенан възпаление

Същият модел е използван и при втората серия (*in vivo*) експерименти, целящи да установят дали активирането на ванилоидните рецептори е общо звено в механизма на противовъзпалителното действие на ноцицептина, структурния му аналог [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и канабиноидите.

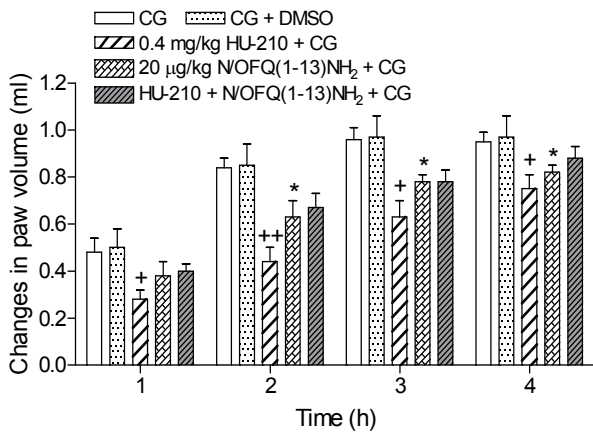
Тази серия експерименти са проведени при тези условия, за които в предходната серия установихме, че N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ потискат възпалителния процес.

Тъй като канабиноидните агонист и антагонист (HU-210, AM251), както и блокера на ноцицептиновите рецептори (JTC-801) се разтварят в DMSO, ефектите им са сравнявани с втората контролна група животни – третирани с CG и DMSO, а тези на разтваряните във физиологичен разтвор

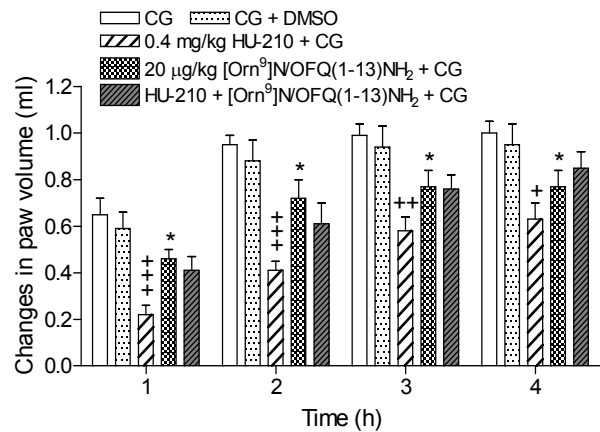
ноцицептинови производни - с другата третирана само с CG контролна група.

Приложен i.p. в доза 0.4 mg/kg, специфичният CB₁-рецепторен агонист HU-210 потиска значително и статистически достоверно предизвикания с CG оток на лапата още от първия час, в сравнение с контролната група (инжектирана с CG и DMSO). Този ефект се запазва през целия период на наблюдение (четири часа). Инхибиторният ефект на самостоятелно въвеждане на HU-210 върху възпалението е значителен и посилен от този на N/OAQ(1-13)NH₂ (Фиг. 19) и неговия аналог [Orn⁹]N/OAQ(1-13)NH₂, макар също да е статистически достоверен (Фиг. 20).

И в двата случая, обаче, едновременното въвеждане на агонисти на двата рецептора (CB₁ и NOP) не засилва противовъзпалителния ефект, а има по-скоро адитивен характер (Фиг. 19, Фиг. 20).



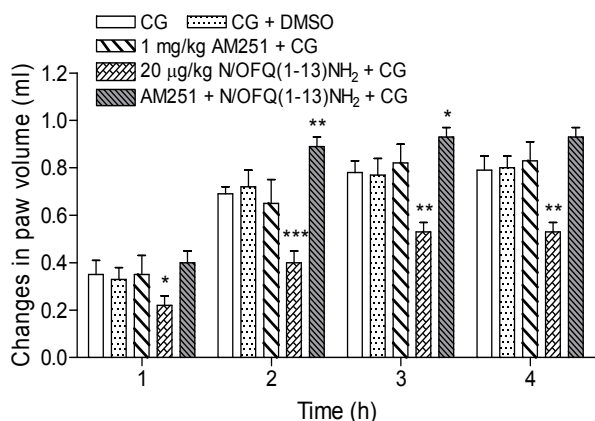
Фиг. 19. Ефекти на HU-210, N/OAQ(1-13)NH₂ и комбинираното им прилагане върху предизвиканото с CG остро възпаление. Данните са представени като средни стойности ± SEM от 6 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни се приемат разлики, при които *p<0.05 спрямо групата, третирана с CG и +p<0.05; ++p<0.01 спрямо групата, третирана с CG + DMSO.



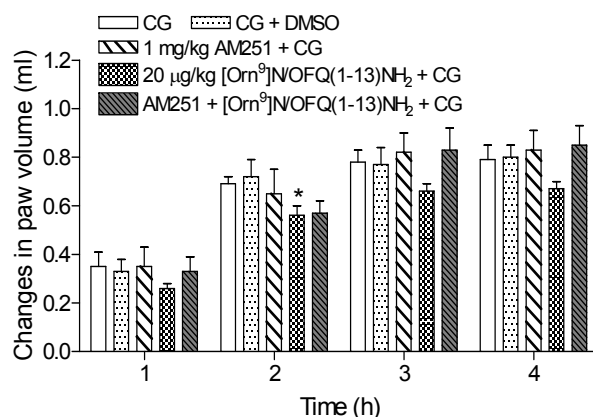
Фиг. 20. Ефекти на HU-210, [Orn⁹]N/OAQ(1-13)NH₂ и комбинираното им прилагане върху предизвиканото с CG остро възпаление. Данните са представени като средни стойности ± SEM от 6 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни се приемат разлики, при които *p<0.05 спрямо групата, третирана с CG и +p<0.05; ++p<0.01; +++p<0.001 спрямо групата, третирана с CG + DMSO.

Въведен i.p. в доза 1 mg/kg, CB₁-рецепторният антагонист AM251 не повлиява съществено отока на възпалената лапа, в сравнение с контролата. Въведени след блокиране на CB₁-рецепторите, N/OAQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OAQ(1-13)NH₂ не проявяват присъщия им потискащ

възпалението ефект, демонстриран при самостоятелното им прилагане (Фиг. 21, Фиг. 22).



Фиг. 21. Ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ върху предизвиканото с CG остро възпаление, след блокиране на CB₁-рецепторите с AM251. Данните са представени като средни стойности ± SEM от 6 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG, се приемат разлики, при които *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.



Фиг. 22. Ефекти на [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху предизвиканото с CG остро възпаление, след блокиране на CB₁-рецепторите с AM251. Данните са представени като средни стойности ± SEM от 6 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG, се приемат разлики, при които *P<0.05.

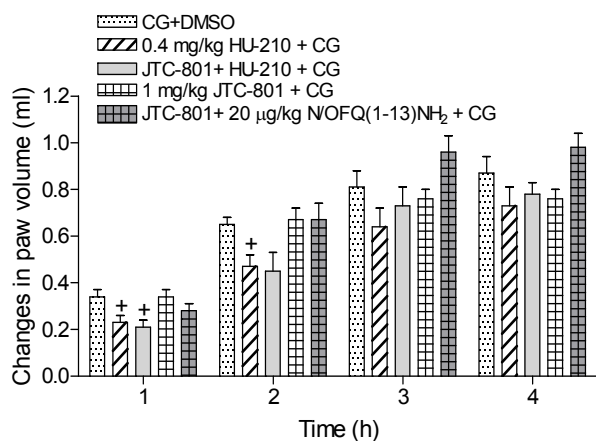
Нещо повече – от втория час до края на експеримента, третираната с AM251 + N/OFQ(1-13)NH₂ група показва завишени, макар и статистически недостоверни разлики в измерения обем на лапите спрямо контролите. Очевидно, блокирането на CB₁-рецепторите предотвратява противвъзпалителното действие на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂.

Вследствие на изложените резултати, може да се допусне, че за да се проявят ефектите на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговия аналог [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ е необходимо или предварителното активиране на CB₁-рецепторите, или че самият N/OFQ(1-13)NH₂ активира канабиноидните рецептори. По-големият оток на възпалената лапа в групата, инжектирана с AM251 и N/OFQ(1-13)NH₂, би могъл да се дължи на способността на N/OFQ(1-13)NH₂ да предизвиква отделяне на хистамин и други проинфламаторни медиатори от мастоцитите или да активира хемотаксиса на неутрофили и лимфоцити.

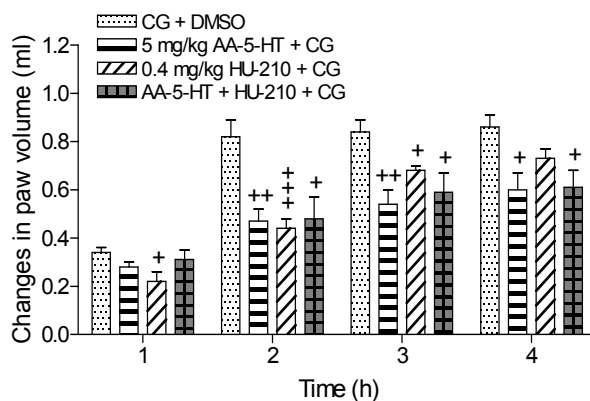
От друга страна, въздействието на HU-210 върху възпалението не се променя от блокирането на ноцицептиновите рецептори и следователно

не е зависимо от функционалното състояние на NOP-репторите. Ефектите на СВ₁-агониста след самостоятелното му прилагане или инжектиран след антагониста за NOP-рецепторите JTC-801 (въведен i.p. в доза 1 mg/kg) са еднакви (Фиг. 23).

За да проверим дали TRPV1-рецепторите участват в реализирането на ефекта на канабиноидите, N/OAQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OAQ(1-13)NH₂, изследвахме тяхното действие върху възпалението след предварително третиране на животните с инхибитора на ванилоидните рецептори AA-5-HT, инжектиран i.p. в доза 1 mg/kg (Фиг. 24).



Фиг. 23. Ефекти на HU-210 върху предизвиканото с CG остро възпаление, след блокиране на ноцицептиновите рецептори с JTC-801. Данните са представени като средни стойности \pm SEM от 6 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG + DMSO, се приемат разлики, при които $+p < 0.05$.

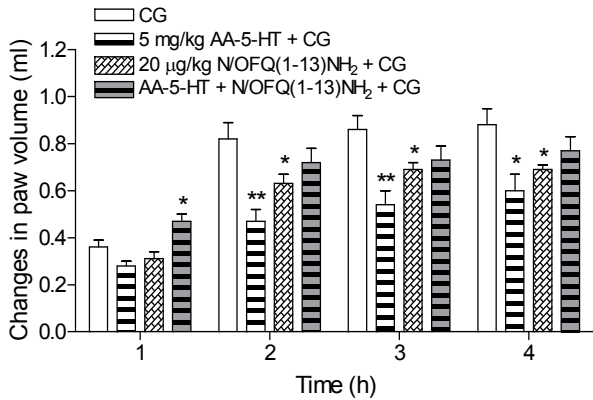


Фиг. 24. Ефекти на HU-210 върху предизвиканото с CG остро възпаление, след блокиране на TRPV1-рецепторите с AA-5-HT. Данните са представени като средни стойности \pm SEM от 6 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG + DMSO, се приемат разлики, при които $+p < 0.05$; $++p < 0.01$; $+++p < 0.001$.

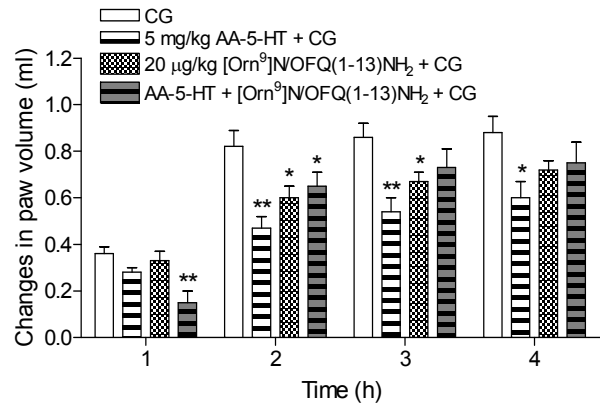
Измерените стойности за обема на лапата при самостоятелното прилагане на AA-5-HT или HU-210, както и на комбинацията AA-5-HT/HU-210/CG, почти не се различават за целия период на наблюдение. Запазването на потискащото отока действие на HU-210, въведен след блокиране на ванилоидните рецептори с 5 mg/kg AA-5-HT, показва, че ванилоидните рецептори не участват в реализиране на ефекта му.

Същевременно, инжектирането на опитните животни с N/OAQ(1-13)NH₂ или с [Orn⁹]N/OAQ(1-13)NH₂, след третирането им с AA-5-HT, като цяло не предотвратява инхибиторното действие на изследваните пептиди – обемът на възпалената лапа е близък до този след самостоятелното прилагане на пептидите (Фиг. 25, Фиг. 26) и при всички

случаи е по-голям, отколкото след самостоятелното прилагане на AA-5-HT.



Фиг. 25. Ефекти на N/OFQ(1-13)NH₂ върху предизвиканото с CG остро възпаление, след блокиране на TRPV1-рецепторите с AA-5-HT. Данните са представени като средни стойности ± SEM от 6 животни за всяка експериментална група. За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG, се приемат разлики, при които *p<0.05; **p<0.01.



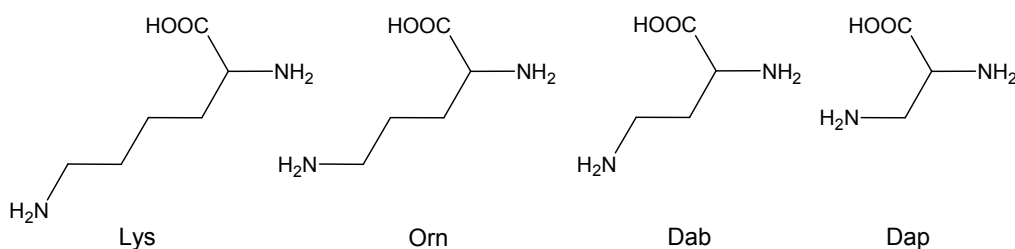
Фиг. 26. Ефекти на [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху предизвиканото с CG остро възпаление, след блокиране на TRPV1-рецепторите с AA-5-HT. Данните са представени като средни стойности ± SEM от 6 животни за всяка експериментална група (с изключение на групата с [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ + CG – 4 животни). За статистически достоверни спрямо групата, третирана с CG, се приемат разлики, при които *p<0.05; **p<0.01.

Последните резултати показват, че изследваните съединения (N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂) реализират ефектите си независимо от ванилоидните рецептори, активирайки собствените си NOP-рецептори.

V. ОБСЪЖДАНЕ

Изследвана е биологичната активност на синтезираните на основата на концепцията “message/address” три серии нови лиганди за ноцицептиновия рецептор с различна дължина на основната верига (шест или тринадесет аминокиселини) и малки структурни промени в приетите съответно за свързваща (“address domain”) или активираща (“message domain”) NOP-рецептора част от молекулата на N/OFQ(1-13)NH₂ и Ac-RYYRWK-NH₂, използвани като базисна матрица.

За да проследим как се променя биологичната активност след последователно скъсяване на страничната верига на Lys с една, две или три метиленови групи, отразява ли се това и как на взаимодействието с NOP-рецептора, в първата серия NOP-рецепторни лиганди ключовата за биологичната активност аминокиселина Lys в позиция девет и/или тринадесет от N/OFQ(1-13)NH₂ е заместена съответно с Orn, Dab или Dap (Фиг. 27):



Фиг. 27. Структурни формули на аминокиселините в девета и/или тринадесета позиция от пептидната верига на N/OFQ(1-13)NH₂ и неговите новосинтезирани производни.

Резултатите от нашите изследвания показват, че заместването на Lys с Orn в позиция девет предизвиква повишаване на биологичната активност, в сравнение с N/OFQ(1-13)NH₂ и останалите новосинтезирани аналози. Подобно заместване в позиция тринадесет, обаче, води до противоположен ефект. Тъй като направените структурни промени в молекулата на N/OFQ(1-13)NH₂ засягат важните за свързването с рецептора аминокиселини (“address domain”), логично е наблюдаваните разлики в биологичната активност на новите съединения от тази серия да се дължат на промяна във взаимодействието с NOP-рецепторите. Защото, положително заредените аминокиселинни остатъци на Arg⁸, Arg¹² и Lys⁹, Lys¹³ са от решаващо значение за окупирането на NOP-рецепторите и се предполага, че взаимодействат с отрицателно заредените аминокиселинни остатъци от втората екстрацелуларна бримка на ноцицептиновия рецептор (Mollereau et al., 1999; Guerrini et al., 2000b). Очаквано е направените структурни модификации в пептидната верига на N/OFQ(1-13)NH₂ да предоставят на неговите деривати различна степен на

структурна комплементарност със свързващия център на рецептора и оттам на различни възможности за конформационни промени при взаимодействието им. Следователно, вероятно е по-силно изразената агонистична активност на $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ да е следствие от повишаване на афинитета за свързване към рецептора, което от своя страна би могло да е резултат от по-добро пространствено разположение на аминокрупата в позиция девет от пептидната верига спрямо нейното място за взаимодействие с рецептора. По-ниските стойности за pEC_{50} на $[\text{Orn}^{13}]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ сочат, че структурни промени в страничната верига на Lys в позиция тринадесет се отразяват негативно на биологичната активност. Можем да приемем, че при заместването на Lys в позиция девет с Orn се получава оптимално за функционирането на центъра на свързване отстояние на аминокрупата от страничната верига на лизина, което не се наблюдава при същото заместване в позиция тринадесет.

Съединенията, получени при следващите замествания на Lys с Dab или Dar в позиция девет или едновременно в двете позиции (девет и тринадесет), инхибират по-слабо гладкомускулните съкращения в сравнение с $[\text{Orn}^9]\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$, т.е. скъсяването на страничната верига на Lys с повече от една $-\text{CH}_2$ група се оказва неблагоприятно за агонистичната активност. Вероятно е по-силното скъсяване на страничната верига на Lys съществено да отслабва електростатичното взаимодействие и съответно формирането на йонни двойки с отрицателно заредените аминокиселинни остатъци в активния център на рецептора, тъй като тези сили на привличане зависят от разстоянието.

Въпреки силно намалената ефективност, слабото потискащо действие върху гладкомускулните съкращения, регистрирано при въвеждане на високи концентрации от тези пептиди е в резултат на селективно взаимодействие с NOP-рецептора.

Чрез втората серия производни на $\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ проучихме изменението на биологичната активност в резултат на структурни промени в аминокрая $\text{Phe}^1\text{-Gly}^2\text{-Gly}^3\text{-Phe}^4$ – или приетата за активизираща (“message domain”) NOP-рецептора част на $\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$.

По-слабите инхибиторни ефекти на съединенията от тази група NOC_1, NOC_3 и NOC_5 (в които Phe в първа позиция е заместена с CnAF с различна големина на циклоалкановия пръстен) в сравнение с $\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ показват, че направените химични модификации в аминокиселинната последователност $\text{Phe}^1\text{-Gly}^2\text{-Gly}^3\text{-Phe}^4$ – на $\text{N}/\text{OFQ}(1-13)\text{NH}_2$ водят до намаляване на биологичната активност, обуславят появата на афинитет към опиоидните рецептори и до голяма степен загуба на селективността към ноцицептиновите рецептори. От анализа на

получените резултати, можем да приемем, че уголемяването на цикъла в заместителя не се отразява съществено на активността на новите аналози, което ни дава основание да допуснем, че не толкова големината на цикъла, колкото ароматният остатък на Phe¹ определя селективността на взаимодействие с ноцицептиновите рецептори. Като цяло, нашите резултати са в съгласие с публикуваното от Salvadori и съавт. (1999), че Phe в първа позиция на полипептидната верига определя афинитета към NOP-рецептора.

Изследванията на съединенията NOC_2, NOC_4 и NOC_6, при които CnAF с различна големина на циклоалкановия пръстен са свързани към Phe в първа позиция от пептидната верига, показват, че те притежават инхибиторно действие (близко до това на N/OFQ(1-13)NH₂) върху електрически предизвиканите съкращения на гладки мускули, без тази активност да е свързана с класическите опиоидни рецептори, тъй като не се наблюдават съществени разлики в инхибиторните ефекти на съединенията от тази група, когато са прилагани самостоятелно или след преинкубиране на гладкомускулните препарати с опиоидния блокер Nal (1.10⁻⁶ M). Те, за разлика от NOC_1, NOC_3 и NOC_5, остават селективни агонисти за NOP-рецепторите.

Внедряването на допълнителен обемен, цикличен заместител, свързан към Phe¹, при съединения NOC_2 и NOC_4 би могло да бъде причината за по-ниската активност на тези съединения в сравнение с N/OFQ(1-13)NH₂, вследствие влошаване на пространственото взаимодействие с активния център на NOP-рецепторите. Нашите резултати се подкрепят и от “структура-активност” проучванията на Reinscheid и съавт. (1996), които предполагат, че по-обемните групи в страничната верига в първа позиция на N/OFQ(1-13)NH₂ могат да възпрепятстват образуването на предпочитаната вторична структура на пептидната верига. Неочаквано, обаче, съединение NOC_6, с най-голям пръстен в CnAF, достига максималния ефект на N/OFQ(1-13)NH₂, но при десет пъти по-висока концентрация.

В заключение можем да кажем, че присъединяването на обемист, цикличен заместител към Phe в първа позиция не променя селективността на новите производни, докато заместването ѝ с CnAF (с различен брой атоми в циклоалкановия пръстен - пет, седем или осем) е свързано със загуба на биологична активност при NOC_1, NOC_3 и NOC_5 и поява на афинитет към класическите опиоидни рецептори. Следователно, заместването на аминокиселината Phe¹ намалява силата, ефективността и селективността на новите аналози на N/OFQ(1-13)NH₂ към ноцицептиновите рецептори.

Въпреки минималната структурна прилика с ноцицептина, синтетичният хексапептид Ac-RYYRWK-NH₂ е една от най-използваните матрици за синтез на нови лиганди за NOP-рецептора, защото съдържа аминокиселинна последователност, определяща висок афинитет и селективност към ноцицептиновия рецептор (изследвания върху *vas deferens* на Mason et al., 2001), както и висока инхибиторна ефективност върху електрически предизвикани гладкомускулни съкращения (Ho et al., 2000).

При нашите изследвания, получените в резултат от модифицирането на Ac-RYYRWK-NH₂ в аминокрая с CnAF (съдържащи 5-, 7- или 8-атомен циклоалканов пръстен) аналози (от третата серия нови лиганди за NOP-рецептора - съединения 3, 4, 5 и 6) притежават понижен афинитет към NOP-рецептора. Подобни резултати получават също Gündüz и сътрудници (2006), които при проучванията си върху “структура-активност” на модифицирани в N-края с други органично-молекулни остатъци (пивалоилов, формилов, бензоилов, мезилов) хексапептиди, потвърждават, че Arg¹ е предпочитана и дори “критична” аминокиселина. Нещо повече – установено е, че и двата аминокиселинни остатъка Arg¹ и Arg⁴ от хексапептидната верига са необходими за проява на афинитет (Judd et al. 2004). Нашите резултати са в съответствие с литературните данни, че наличието на Arg в първа позиция от пептидната верига се изисква за запазване на афинитета и селективността към NOP-рецептора, след като заместването на Arg¹ с CnAF при съединение 3 води до загуба на афинитет към ноцицептиновите рецептори. При другите две съединения 4 и 6, наличието или липсата на активност към класическите опиоидни рецептори не може да се коментира, тъй като те практически не проявяват ефект върху гладкомускулните съкращения в прилаганите концентрации. Може да се отбележи единствено факта, че нарастването на пръстена в заместителя повлиява в неблагоприятна посока биологичната активност на новите съединения.

От нашите резултати може да се направи заключението, че заместването на Arg в първа позиция от пептидната верига на Ac-RYYRWK-NH₂ с 1-(метоксифосфоно)метиламиноциклоалкан карбоксилни киселини намалява N/O/FQ-подобната активност на новосинтезираните аналози.

Една от поставените задачи бе да се установи дали биологичната активност, наблюдавана при изследвания върху относително опростената система на изолирани органи, се проявява и върху цял организъм, където множеството сложни регулаторни механизми могат да променят значително и дори да елиминират наблюдаваните *in vitro* ефекти.

Логично е да се предположи, че при еднакви експериментални условия разграждането на N/OFQ(1-13)NH₂ и структурните му аналози би следвало да се извършва по еднакъв механизъм, поради минималните структурни различия между тях. Тъй като единствената разлика в структурата на N/OFQ(1-13)NH₂, [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ е по-късата странична верига на аминокиселината в девета позиция, ние допуснахме, че трите пептида следва да се метаболизират от едни и същи ензими. Поради това, очаквахме N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ да имат сходни по своя характер ефекти *in vivo* върху предизвиканото с CG остро възпаление, подобно на ефектите им върху гладки мускули. Противоположно на това, обаче, резултатите от експериментите с N/OFQ(1-13)NH₂, [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ и [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂, инжектирани едновременно или 15 минути преди CG, показват разлики в ефектите им, не само по характер, но и по динамика, върху предизвиканото с карагенан периферно възпаление.

Тъй като метаболизмът на ноцицептина е времезависим (Montiel et al., 1997), последователно образуващите се фрагменти с различна дължина и активност е възможно да се различават по йонните взаимодействия на базичните аминокиселини и/или конформационно-свързания достъп на чувствителните към ензимното действие връзки до активния център на разграждащите ензими. Това разграждане би могло да бъде по-бързо за N/OFQ(1-13)NH₂ (инжектиран едновременно с CG), отколкото за [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ или [Dab⁹]N/OFQ(1-13)NH₂. Възможно е [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ (или негови фрагменти) да взаимодействат по-бавно с NOP-рецепторите, което да обясни по-бързия ефект на N/OFQ(1-13)NH₂ (приложен едновременно с CG) и “закъснелия” във времето ефект на [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ (по-бавното настъпване и по-продължителния модулиращ ефект при инжектиране 15 мин. преди CG).

Наблюдаваният от нас по-продължителен противовъзпалителен ефект на [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ добре корелира с получените от Terenius и съавт. (2000) данни, че по-късите N-терминални фрагменти са способни да блокират освобождаването на SP от окончанията на първичните сетивни С-неврони.

Следователно, могат да се допуснат следните възможни механизми за действието на изследваните пептиди върху периферното възпаление:

1. Потискане на неврогенната компонента на възпалителния процес или
2. Повлияване на образуването на свободни радикали.

Планираните от нас допълнителни изследвания, проведени в лабораторията “Свободно-радикални процеси“ (ИНБ) показват, че

независимо от времето на прилагане - нито N/OFQ(1-13)NH₂, нито [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ модулират предизвиканите от CG промени в антиоксидантния статус на тъканни хомогенати от лапите. Следователно, механизмът на действие на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ не е свързан с повлияване на свободно-радикалните процеси.

От систематизираните тук резултати може да се направи заключението, че N/OFQ(1-13)NH₂ въведен *in vivo* едновременно с CG, а [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ въведен 15 мин. преди CG, потискат развитието на възпалителния процес, като най-вероятно въздействието им е предимно върху неврогенната компонента на карагенановото възпаление. Основание за такова заключение дават и цитираните литературни данни (Helyes et al., 1997), според които ноцицептинът повлиява неврогенното възпаление (при друг експериментален модел) чрез инхибиране на освобождаването на SP и CGRP от терминалите на сетивните неврони, без да повлиява неневрогенната компонента.

Резултатите, получени от изследванията върху взаимодействието на N/OFQ(1-13)NH₂ и структурния му аналог [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ с TRPV1-рецепторите и връзката им с канабиноидната система при карагенанов модел на остро възпаление, ни дават основание да направим следните изводи:

1. N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ осъществяват своето противовъзпалително действие чрез взаимодействие със собствени рецептори, разположени върху първичните сетивни неврони.

2. Ванилоидните рецептори не участват в реализирането на противовъзпалителното действие на ноцицептиновите агонисти N/OFQ(1-13)NH₂ и структурния му аналог [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂.

3. Едновременното инжектиране на животните с канабиноидни (HU-210) и ноцицептинови агонисти (N/OFQ(1-13)NH₂ или [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂) не потенцира противовъзпалителното действие (в сравнение със самостоятелното им прилагане). Общото им въвеждане има адитивен ефект.

4. Съществува функционална връзка между NOP- и CB₁-рецепторите. За реализиране на ефектите на ноцицептиновите агонисти N/OFQ(1-13)NH₂ и неговия структурен аналог [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ върху острото периферно възпаление са необходими свободни или активирани канабиноидни CB₁-рецептори, защото след блокиране на CB₁-рецепторите с AM251 инхибиторния им ефект върху възпалението не се проявява. Освен това, въвеждането на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ на този фон предизвиква по-голям оток, в сравнение със стойностите, достигани в контролната група в същите времеви интервали. Това логично може да се обясни с отделянето на

хистамин и други проинфламаторни медиатори от мастоцитите под действие на N/OFQ(1-13)NH₂, което е установено в кожа и перитонеум от (Kimura и съавт. 2000), а също и в мозък (Tekes и съавт. 2006).

5. Проявата на противовъзпалителни ефекти на канабиноидния агонист HU-210 не зависи от функционалното състояние на ноцицептиновите рецептори.

Досега, в достъпната ни литература съществуват много малко изследвания относно вероятната връзка между канабиноидните CB₁- и NOP-рецепторите *in vivo*. Изводите се затрудняват силно и от различните механизми, по които отделните агонисти и антагонисти на канабиноидните рецептори осъществяват ефектите си. Например, активирането на CB₁-рецепторите от ендогенния канабиноид анандамид намалява активността на TRPV1-рецепторите в първичните сетивни неврони (Kim et al., 2007), докато WIN 55,212-2 (смесеният CB₁/CB₂-рецепторен агонист) предизвиква хипотермия по механизъм, невключващ участието на TRPV1-рецепторите (Mahmud et al., 2009). Изследвайки ефектите на NOP-рецепторния антагонист JTC-801 върху предизвиканата при централно въвеждане на канабиноиди хипотермия у плъхове, Rawls и съавт. (2007) установяват, че той силно понижава предизвиканата от CB₁-агонисти хипотермия. Според тях, активирането на NOP-рецепторите е предварително условие, за да се реализира хипотермичното действие на канабиноидите. Получените от нас резултати при използвания модел и периферно приложение, ни дават основание да заключим точно обратното: че при тези условия, ноцицептиновият ефект се опосредства от активирани или свободни CB₁-рецептори. Съпоставянето на изводите от тези две работи ни позволява да потвърдим функционалната връзка между ноцицептиновата и канабиноидна система, като крайният резултат от това взаимодействие силно зависи от модулираната функция и мястото на действие – централна нервна система или периферия.

VI. ИЗВОДИ

1. При използваните *in vitro* експериментални условия, N/OFQ(1-13)NH₂, Ac-RYYRWK-NH₂ и новосинтезираните им аналози понижават в различна степен амплитудата на предизвиканите с LFES гладкомускулни съкращения на изолирани простатични сегменти от *vas deferens* на плъх, без да променят мускулния тонус.

2. Модифицираните с Orn, Dab или Dar в позиция девет и/или тринадесет производни на N/OFQ(1-13)NH₂ осъществяват ефектите си чрез селективно взаимодействие с NOP-рецепторите.

3. Аминокиселината Lys в позиции девет и тринадесет от пептидната верига на N/OFQ(1-13)NH₂ е от съществено значение за биологичната му активност:

3.1. Скъсяването на дължината на страничната верига на Lys с една –CH₂ група, в позиция девет от пептидната верига на N/OFQ(1-13)NH₂, води до засилване на биологичната активност;

3.2. Противоположно на това, подобно скъсяване в позиция тринадесет, както и едновременно в позиции, девет и тринадесет или скъсяване с повече от една –CH₂ група, води до изразено отслабване на агонистичната активност и ефективността на новосинтезираните аналози на N/OFQ(1-13)NH₂. Това най-вероятно се дължи на измененото разстояние между основната пептидна верига и активния център на рецептора.

4. Аминокиселините Phe или Arg в първа позиция от пептидната верига, съответно на N/OFQ(1-13)NH₂ или Ac-RYYRWK-NH₂, имат важна роля за биологичната им активност:

4.1. Наличието на аминокиселините Phe¹ и Arg¹ определя селективността към NOP-рецепторите, а отстраняването им води до поява на активност към класическите опиоидни рецептори;

4.2. Заместването на Phe или Arg в първа позиция на тези вериги съответно с CnAF (съдържащи 5-, 7- или 8-атомен циклоалканов пръстен), води до понижаване на афинитета, ефективността и селективността на новите аналози към NOP-рецепторите и поява на активност към класическите опиоидни рецептори;

4.3. Внедряването на обемен цикличен заместител към Phe или Arg в първа позиция от пептидната верига, съответно на N/OFQ(1-13)NH₂ или Ac-RYYRWK-NH₂, за разлика от заместването им, не води до загуба на селективността на новите аналози към NOP-рецепторите.

5. При използваните *in vivo* експериментални условия, N/OFQ(1-13)NH₂ и структурният му аналог [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ потискат

неврогенната компонента на острия възпалителен процес, без да проявяват про- или антиоксидантни свойства.

5.1. Съществува функционална връзка между NOP- и CB_1 -рецепторите, която не се медира от ванилоидните (TRPV1) рецептори при модел на предизвикано с карагенан остро периферно възпаление;

5.2. Най-вероятно, $N/O\text{FQ}(1-13)\text{NH}_2$ и $[\text{Orn}^9]N/O\text{FQ}(1-13)\text{NH}_2$ осъществяват своето противовъзпалително действие чрез взаимодействие със собствените си NOP-рецептори, разположени върху първичните сетивни неврони;

5.3. Наличието на активирани или свободни канабиноидни CB_1 -рецептори е условие, за да се реализират инхибиторните ефекти на $N/O\text{FQ}(1-13)\text{NH}_2$ и $[\text{Orn}^9]N/O\text{FQ}(1-13)\text{NH}_2$ при използвания експериментален модел.

VII. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път е изследвано как се променя биологичната активност на N/OFQ(1-13)NH₂ при последователното скъсяване на дължината на страничната верига на Lys в позиции девет и/или тринадесет от пептидната му верига. Установено е, че заместването на аминокиселината Lys със структурните ѝ аналози Orn, Dab или Dar води до промяна на афинитета и ефективността на новосинтезираните аналози, но не и на селективността им към NOP-рецепторите.

2. За първи път са получени данни за биологичната активност на пептидни аналози на N/OFQ(1-13)NH₂ и Ac-RYYRWK-NH₂, съдържащи в аминокрая CnAF (с 5-, 7- или 8-атомен пръстен). Установено е, че новите съединения потискат в различна степен предизвиканите с LFES гладкомускулни съкращения на *vas deferens* от плъх. Потвърдено е значението на аминокиселините Phe и Arg в първа позиция от тези пептидни вериги за запазване на селективността и ефективността им.

3. Получени са оригинални данни в подкрепа на хипотезата, че N/OFQ(1-13)NH₂ и структурният му аналог [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ потискат неврогенната компонента на острия възпалителен процес в периферията.

4. Установено е, че ванилоидните (TRPV1) рецептори не участват в механизма на противовъзпалителното действие на N/OFQ(1-13)NH₂ и [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ при модел на остро, предизвикано с карагенан периферно възпаление, като е показано, че ефектите на изследваните пептиди не се променят след блокиране на TRPV1-рецепторите.

5. Доказано е съществуването на функционална връзка между NOP-рецептора и канабиноидните CB₁-рецептори при модел на остро, предизвикано с карагенан периферно възпаление, като за първи път е показано, че инхибиторният ефект на изследваните пептиди не се проявява след блокиране на CB₁-рецепторите.

VIII. ПРИЛОЖЕНИЯ

8.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Zamfirova R., Tzvetanova E., Aleksandrova A., Petrov L., **Mateeva P.**, Pavlova A., Kirkova M., Todorov S. (2009) *In vivo* effects of N/OFQ(1-13)NH₂ and its structural analogue [ORN⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ on carrageenan-induced inflammation: rat-paw oedema and antioxidant status. *Central European Journal of Biology*, 4(2), 170-178. **IF=0,915**
2. Naydenova E., Todorov P., **Mateeva P.**, Zamfirova R., Pavlov N., Todorov S. (2010) Synthesis and biological activity of novel small peptides with aminophosphonates moiety as NOP receptor ligands. *Amino Acids*, 39(5), 1537-1543. **IF=4,106**
3. **Mateeva P.**, Zamfirova R., Pajpanova T., Naydenova E., Vezenkov L. (2011) Changes in the biological activity of N/OFQ(1-13)NH₂ after substitution of Lys⁹ by canavanine, Dab and Dap. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 64(11), 1645-1650. **IF=0,210**
4. **Mateeva P.**, Zamfirova R. (2013) Involvement of vanilloid- and cannabinoid receptors in the anti-inflammatory action of nociceptin. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 66(2), 273-280. **IF=0,210 (2011)**

8.2. НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Zamfirova R., Jivkova V., Naydenova E., **Mateeva P.**, Todorov S. (2006) Structure-activity relationship studies on modified nociceptin analogues. 29th *Balkan Medical Week "Ecology, Man, Health"*, September 28-29, 2006, Golden Sands – Varna, Bulgaria, p. 97.
2. **Mateeva P.I.**, Petrov L., Tzvetanova E., Pavlova A., Kirkova M. and Zamfirova R. (2008) Effects of nociceptin and [Orn⁹]nociceptin on carrageenan-induced inflammation in rat paw. Vth *Bulgarian Peptide Symposium*, May 28-30, 2008, Blagoevgrad (Bachinovo), Bulgaria, p. 60.
3. Petrov L., Tzvetanova E., Pavlova A., **Mateeva P.**, Kirkova M. and Zamfirova R. (2008) 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. *Vth Bulgarian Peptide Symposium*, May 28-30, 2008, Blagoevgrad (Bachinovo), Bulgaria, p. 38.

4. **Mateeva P.**, Zamfirova R., Todorov P., Pavlov N., Naydenova E., Todorov S. (2009) Biological activity of novel hexapeptide derivatives synthesized with $C\alpha,\alpha$ -disubstituted cyclic amino phosphonates. *VI National Congress of Pharmacology*, October 2009, Varna, Bulgaria, p. 36.

5. **Mateeva P.**, Zamfirova R., Todorov P., Naydenova E. (2011) Biological activity of novel peptides as nociceptin-receptor ligands. *4th International Congress of Molecular Medicine*, June 27-30, 2011, Istanbul, Turkey, 196, p. 541.

6. Zamfirova R., Todorov P., **Mateeva P.**, Pavlov N., Naydenova E. (2011) Synthesis and biological activity of novel hexapeptides with aminophosphonates moiety as nociceptin receptor ligands. *4th International Congress of Molecular Medicine*, June 27-30, 2011, Istanbul, Turkey, 283, p. 573.

7. **Mateeva P.**, Todorova P. Are cannabinoid and vanilloid receptors involved in the anti-inflammatory action of N/OFQ(1-13)NH₂ and [Orn⁹]N/OFQ(1-13)NH₂: In vivo effects on carrageenan-induced rat-paw inflammation? *VI^{ma} работна среща "Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти"*, 2011, 28-30 ноември, София, България, p. 53.

8.3. ЦИТИРАНИЯ НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД (ДО М. МАЙ, 2013 Г.)

Zamfirova R., Tzvetanova E., Alexandrova A., Petrov L., Mateeva P., Pavlova A., Kirkova M., Todorov S.

In vivo effects of N/OFQ(1-13)NH₂ and its structural analogue [ORN⁹]N/OFQ(1-13)NH₂ on carrageenan-induced inflammation: Rat-paw oedema and antioxidant status

2009, *Central European Journal of Biology*, 4(2), 170-178

1. Karakus E., Halici Z., Albayrak A., Bayir Y., Aydin A., Unal D., Cadirci E., Ferah I. Odaci, E. 2013. 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* 112(3): 156-163.

Naydenova E.D., Todorov P.T., Mateeva P.I., Zamfirova R.N., Pavlov N.D., Todorov, S.B. **Synthesis and biological activity of novel small peptides with aminophosphonates moiety as NOP receptor ligands** 2010, *Amino Acids*, 39(5), 1537-1543

1. Bodnar R.J. Endogenous opiates and behavior: 2010. 2011. *Peptides* 32(12): 2522-2552.
2. Abdel-Megeed M.F., Badr B.E., Azaam M.M., El-Hiti G.A. 2012. Synthesis, antimicrobial and anticancer activities of a novel series of diphenyl 1-(pyridin-3-yl)ethylphosphonates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 20(7): 2252-2258.
3. Abdel-Megeed M.F., Badr B.E., Azaam M.M., El-Hiti G.A. 2012. Synthesis and antimicrobial activities of a novel series of heterocyclic α -aminophosphonates. *Archiv der Pharmazie* 345(10): 784-789.
4. Abdel-Megeed M.F., Badr B.E., Azaam M.M., El-Hiti G.A. 2012. Synthesis and antimicrobial activities of Diphenyl(Arylamino)(1-Phenyl-3- (Pyridin-2-Yl)-1 H -Pyrazol-4-Yl)Methylphosphonates. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements* 187(12): 1462-1468.
5. Kril A., Topashka-Ancheva M., Iliev I., Gerasimova T., Kraicheva I., Tsacheva I., Vodenicharova E., Troev K. 2012. In vitro antitumour activity, genotoxicity, and antiproliferative effects of aminophosphonic acid diesters and their synthetic precursors. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 67 C(9-10): 473-480.
6. Abdel-Megeed M.F., Azaam M.M., El-Hiti G.A. 2013. Diphenyl (4'-(Aryldiazenyl)biphenyl-4-ylamino)(pyridin-3-yl) methylphosphonates as Azo disperse dyes for dyeing polyester fabrics. *Journal of Chemistry* art. no. 308419.
7. Reddy N.B., Sundar Ch.S., Rani Ch.R., Rao K.U.M., Nayak S.K., Cirandur Suresh Reddy C.S. Triton X-100 catalyzed synthesis of α -aminophosphonates. *Arabian Journal of Chemistry* Available online 31 July 2011; In Press, Corrected Proof <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.07.025>