

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ
ФАРМАЦЕВТИЧЕН ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ФАРМАКОЛОГИЯ И ЛЕКАРСТВЕНА ТОКСИКОЛОГИЯ

Д-Р НИНА ДИМИТРОВА ДОНЧЕВА

**СРАВНИТЕЛНО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО
ИЗСЛЕДВАНЕ НА АНАЛГЕТИЧНО И
ПРОТИВОВЪЗПАЛИТЕЛНО ДЕЙСТВИЕ
НА СРЕДСТВА, ПРИЛАГАНИ ЗА СЪПЪТСТВАЩА
ТЕРАПИЯ НА БОЛКАТА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен
„доктор“

Докторска програма „Фармакология“
(вкл. фармакокинетика и химиотерапия)

Научен ръководител:
Проф. д-р Дамянка П. Гетова-Спасова, дмн

Рецензенти:
Проф. д-р Л. Пейчев, дм, мзм
Проф. д-р Н. Бояджиева, дмн

Пловдив, 2016

Дисертационният труд е написан на 127 страници. Той е онагледен с 34 фигури и 15 таблици. Цитирани са 238 литературни източника.

Докторантът работи като асистент в Катедрата по фармакология и лекарствена токсикология към Фармацевтичен факултет на Медицински университет – Пловдив.

Експерименталните изследвания са проведени в Катедрата по фармакология и лекарствена токсикология и в Научно-изследователския център по имунология към Катедрата по микробиология и имунология на Медицински университет – Пловдив.

Дисертационният труд е одобрен и насрочен за защита от разширен катедрен съвет на Катедрата по фармакология и лекарствена токсикология към ФФ на МУ – Пловдив, състоял се на 06.06.2016 година.

Докторантът е отчислен с право на защита със Заповед № Р-1514/28.06.2016 година на Ректора на МУ – Пловдив чл.-кор. проф. д-р Стефан Костянев, дмн.

Дисертационният труд е насрочен за защита пред научно жури в състав:

Проф. д-р Л. Пейчев, дм, мзм

Проф. д-р Д. Гетова-Спасова, дмн

Проф. д-р Н. Бояджиева, дмн

Проф. д-р С. Сурчева, дм

Доц. д-р М. Ганева, дм

Резервни членове: Проф. д-р Я. Илиев, дм и Доц. д-р И. Ламбев, дм

Защитата на дисертационния труд ще се състои наотчаса вАудитория на Аудиторен комплекс на МУ – Пловдив.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по фармакология и лекарствена токсикология на МУ – Пловдив и са публикувани на интернет страницата на МУ – Пловдив.

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ.....	5
ЦЕЛ.....	8
ЗАДАЧИ.....	8
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ.....	9
1. Експериментални животни	9
2. Използвани лекарствени продукти и химични съединения	11
3. Експериментални методи	11
4. In vitro изследване на про-инфламаторни цитокини	14
5. Статистическа обработка на получените резултати.....	14
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	15
1. Изследване на аналгетична и противовъзпалителна активност на използваните вещества при еднократно прилагане.	15
2. Изследване на аналгетична и противовъзпалителна активност на използваните вещества при многократно прилагане.....	23
3. Изследване на аналгетична активност на използваните вещества при модел на невропатна болка.	31
3.1. Изследване на аналгетична активност на използваните вещества при тест „гореща плоча“	31
3.2. Изследване на аналгетична активност на използваните вещества при тест „аналгезиметър“	33
4. Промени в серумните концентрации на TNF- α и IL-6 при липополизахарид-индуцирано възпаление и многократно прилагане на изследваните вещества....	34
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	38
ИЗВОДИ.....	43
ПРИНОСИ	44
СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	45

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА БЪЛГАРСКИ ЕЗИК

АЛА – алфа липоева киселина

НСПВС – нестероидни противовъзпалителни средства

ЦНС – централна нервна система

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА АНГЛИЙСКИ ЕЗИК

ALA – алфа липоева киселина

AP-1 – активатор протеин едно

CGRP – калцитонин – ген свързан пептид

COX-2 – циклооксигеназа две

DHLA – дихидро липоева киселина

ELISA – ензим-свързан имуносорбентен тест

5-HT – 5-хидрокситриптамин

IL-1 α – интерлевкин едно алфа

IL-1 β – интерлевкин едно бета

IL-6 – интерлевкин шест

INF- γ – интерферон гама

iNOS – индуцируема азотен оксид синтаза

LPS – липополизахарид

LT-B4 – левкотриен Б четири

MCP-1 – моноцитен хемотаксичен пептид едно

NF- κ B – нуклеарен фактор капа Б

NK-1 – неврокинин-1

NMDA – N-methyl-D-aspartat

NO – азотен оксид

PG E2 – простагландин Е две

ROS – реактивни кислородни радикали

TNF- α – тумор некротизиращ фактор алфа

ВЪВЕДЕНИЕ

Болката е субективно неприятно сензорно и емоционално преживяване, което се дължи на актуално или потенциално увреждане на тъканите. Болката се класифицира по различни критерии: според продължителността, патофизиологията и анатомичната локализация. Според продължителността си болката може да бъде остра или хронична. Според патофизиологичните механизми, които я предизвикват, болката се класифицира като ноцицептивна или невропатна. При класическата ноцицептивна болка е налице интактна нервна система, докато невропатния тип болка не изисква директно дразнене на ноцицептора и най-често се дължи на увреждане на нервната система. Според международната асоциация за изучаване на болката (IASP), невропатната болка се дефинира като болка, причинена от първична лезия или дисфункция на периферната или централната нервна система (Chong MS, Vajwa ZH, 2003).

Първата стъпка в лечението на болката е нейното определяне като ноцицептивна или невропатна, защото двата вида болка се повлияват от различни медикаменти (Миланов И, 2009). За лечението на ноцицептивната болка се използват аналгетици (опиоидни и неопиоидни) и нестероидни противовъзпалителни средства (НСПВС).

Невропатната болка се повлиява основно от антидепресанти, които засилват ендогенната модулация на болката чрез десцендиращата булбо-спинална норадренергична и серотонинергична инхибиция и антиконвулсанти, които потискат абнормната невронна хипервъзбудимост и ектопичното генериране на импулси в аксона. Патофизиологичните механизми на невропатната болка са все още ненапълно изяснени и лечението често е незадоволително.

Европейската асоциация на неврологичните дружества препоръчва за лечението на невропатна болка на първо място трицикличните антидепресанти, габапентин и прегабалин (Attal N et al, 2006). Клиничната ефективност на тези медикаменти е свързана с около 50% намаляване на болката и висока честота на нежелани лекарствени реакции, което обуславя търсенето на алтернативни медикаменти.

Експериментални изследвания върху лабораторни животни установяват периферни и централни патофизиологични процеси в механизма на невропатната болка. Директното увреждане на нерва предизвиква локален инфламаторен отговор и освобождаване на редица

медиатори – хистамин, брадикинин, серотонин, аденозин трифосфат, PG E₂, LT-B₄, IL-4, IL-6, TNF- α . Експериментални проучвания показват, че NO е важен медиатор, отговорен за развитието на хипералгезията в централната нервна система. Увредените ноцицептивни неврони освобождават калцитонин-ген свързан пептид (CGRP) и субстанция P (SP). Тези неuropeптиди предизвикват вазодилатация и секреция на инфламаторни медиатори от мастоцитите и левкоцитите (неврогенно възпаление). В резултат на това, ноцицепторите, които са неактивни и нереагиращи при нормални условия могат да покажат повишена чувствителност (понижен праг на стимулация и по-продължителен отговор при стимулация) с развитие на спонтанни разряди.

Глутаматът е възбуден медиатор в ЦНС, който активира две групи рецептори – йонотропни и метаболотропни. От глутаматните рецептори NMDA участват в хроничните болкови синдроми. Те се откриват в задния рог на гръбначния мозък и в първичните аферентни неврони, които инервират периферните нерви. Стимулирането на NMDA рецепторите в гръбначния мозък индуцира освобождаването на невромедиаторите субстанция P и калцитонин ген-свързания пептид, които усилват ноцицептивните стимули и действат проноцицептивно. Кетаминът повлиява периферна и централна невропатна болка чрез некомпетитивен антагонизъм на NMDA рецепторите, като потиска рецепторната активност и проводимостта на натриевите и калиеви йонни канали в гръбначния мозък, когато са отворени (Macres S, Richeimer S, Duran P, 2004).

Витамин B1 играе ключова роля в окислителното разграждане на глюкозата, процес, който доставя енергия за нервните клетки. При повишени нива на глюкоза в организма е завишена и потребността от Витамин B1. Участвайки в ензимна система, генерираща енергия, в метаболизма на въглехидрати и мастни киселини, тиаминът и неговият мастноразтворим аналог бенфотиамин се използват за лечение на възпалителни и дегенеративни процеси на периферните нерви като диабетна полиневропатия, алкохолни и постинфекциозни полиневрити, радикулити и травматични увреждания на ЦНС.

В резултат на хипергликемията при захарен диабет в стената на кръвоносните съдове се натрупват т. нар. „крайни продукти на гликирането“. Този процес води до ендоневрална хипоксия и исхемия и е свързан с увеличено производство на свободни кислородни радикали, които увреждат периферните нерви, както и с изчерпване на

антиоксидантите, като глутатион. Алфа-липоевата киселина е ендогенна субстанция, като основните ѝ биологични ефекти са свързани предимно със силните ѝ антиоксидантни свойства. Основно терапевтично показание на алфа-липоевата киселина е сетивни нарушения при диабетна полиневропатия (парастезии, чувство на парене, болка, изтръпване, мравучкане). При редица експериментални проучвания е установено, че алфа-липоевата киселина намалява плазмените нива на проинфламаторни протеини, като IL-6, TNF- α и iNO синтаза.

Съвременните усилия са насочени към предотвратяване развитието на невропатната болка и адекватен и предсказуем контрол на съществуваща вече такава. За тази цел се прилагат кетамин, габапентин, бенфотиамин и алфа-липоева киселина.

ЦЕЛ

Целта на настоящето проучване е да се сравни противоболковото и противовъзпалително действие на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин, приложени в различни дози еднократно и многократно при интактни плъхове и такива с модел на невропатна болка, както и повлияване на TNF- α и IL-6 при LPS индуцирано възпаление.

ЗАДАЧИ

1. Да се изследва противоболковия ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин, приложени в различни дози при модел на болка, причинена от топлинен стимул при еднократно и многократно приложение.
2. Да се изследва противоболковия ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин, приложени в различни дози при модел на болка, причинена от механичен стимул при еднократно и многократно приложение.
3. Да се изследва противоболковия ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин, приложени в различни дози при модел на болка, причинена от химичен болков стимул при еднократно и многократно приложение.
4. Да се изследва противовъзпалителния ефект на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин, приложени в различни дози еднократно и многократно при модел на възпаление с карагенин.
5. Да се изследват ефектите на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин, приложени в ефективна доза многократно при модел на невропатна болка:
 - а) при тест с топлинен болков стимул.
 - б) при тест с механичен болков стимул.
6. Да се изследва влиянието на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при многократно приложение върху нивата на проинфламаторните цитокини TNF- α и IL-6 при липополизахарид-индуцирано възпаление.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Експериментални животни

Всички експерименти са проведени съгласно Изискванията и Правилата за работа с лабораторни животни. За проучването е получено Разрешително за използване на животни в опити № 73/03.12.2012 година от Българска агенция по безопасност на храните към Министерство на земеделието и храните и от Комисия по научна етика към Медицински университет – Пловдив – Протокол № 4/25.06.2015 г.

Използвани бяха мъжки плъхове порода Wistar с тегло 170 – 220 грама (n = 496). Животните бяха отглеждани при стандартни лабораторни условия: 12:12 часа тъмно-светъл цикъл, 45% относителна влажност на въздуха, температура $23 \pm 1^\circ\text{C}$ и свободен достъп до храна и вода.

Всички изследвани групи са тествани за противоболково и противовъзпалително действие след еднократно и многократно 14-дневно третиране.

За изследване аналгетично и противовъзпалително действие на бенфотиамин са използвани пет групи по осем животни както следва:

I група (контрола) – третирани с физиологичен разтвор интраперитонеално (i. p.);

II група (позитивна контрола) – третирани с метамизол в доза 150 мг/кг (i. p.) при аналгетичните тестове или диклофенак в доза 25 мг/кг (i. p.) при теста с възпаление;

III група – третирани с бенфотиамин в доза 20 мг/кг перорално;

IV група – третирани с бенфотиамин в доза 40 мг/кг перорално;

V група – третирани с бенфотиамин в доза 80 мг/кг перорално.

За изследване аналгетично и противовъзпалително действие на алфа-липоева киселина са използвани пет групи по осем животни както следва:

I група (контрола) – третирани с физиологичен разтвор интраперитонеално (i. p.);

II група (позитивна контрола) – третирани с метамизол в доза 150 мг/кг (i. p.) или диклофенак в доза 25 мг/кг (i. p.);

III група – третирани с алфа-липоева киселина в доза 30 мг/кг (i. p.);

IV група – третирани с алфа-липоева киселина в доза 60 мг/кг (i. p.);

V група – третирани с алфа-липоева киселина в доза 90 мг/кг (i. p.).

За изследване аналгетично и противовъзпалително действие на габапентин са използвани пет групи по осем животни както следва:

I група (контрола) – третиран с физиологичен разтвор интраперитонеално (i. p.);

II група (позитивна контрола) – третиран с метамизол в доза 150 мг/кг (i. p.) или диклофенак в доза 25 мг/кг (i. p.);

III група – третиран с габапентин в доза 30 мг/кг (i. p.);

IV група – третиран с габапентин в доза 60 мг/кг (i. p.);

V група – третиран с габапентин в доза 100 мг/кг (i. p.).

За изследване аналгетично и противовъзпалително действие на кетамин са използвани пет групи по осем животни както следва:

I група (контрола) – третиран с физиологичен разтвор интраперитонеално (i. p.);

II група (позитивна контрола) – третиран с метамизол в доза 150 мг/кг (i. p.) или диклофенак в доза 25 мг/кг (i. p.);

III група – третиран с кетамин в доза 30 мг/кг (i. p.);

IV група – третиран с кетамин в доза 40 мг/кг (i. p.);

V група – третиран с кетамин в доза 50 мг/кг (i. p.).

За изследване аналгетично действие на многократно приложени бенфотиамин, алфа липоева киселина, габапентин и кетамин при модел на невропатна болка са използвани шест групи по осем животни както следва:

I група (sham контрола) – оперирана, без лигиране на n. ischiadicus;

II група (контрола) – лигиране на n. ischiadicus и третиран с физиологичен разтвор (i. p.);

III група – лигиране на n. ischiadicus и третиран с бенфотиамин в доза 20 мг/кг (i. p.);

IV група – лигиране на n. ischiadicus и третиран с алфа-липоева киселина в доза 60 мг/кг (i. p.);

V група – лигиране на n. ischiadicus и третиран с габапентин в доза 60 мг/кг (i. p.);

VI група – лигиране на n. ischiadicus и третиран с кетамин в доза 50 мг/кг (i. p.).

За изследване влиянието на многократно приложените бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин върху серумните нива на провъзпалителните цитокини TNF- α и IL-6 бяха използвани 52 мъжки бели плъха порода Вистар.

Четири часа преди вземането на кръвта за изследване животните бяха третиран с липополизахарид в доза 250 μ g/kg интраперитонеално еднократно.

2. Използвани лекарствени продукти и химични съединения

2.1. Лекарствени продукти:

Benfotiamin (Benfogamma, Wörwag pharma), Alpha-lipoic acid (Thiogamma, Wörwag pharma), Gabapentin (Gabagamma, Wörwag pharma), Ketamine (Calipsol, Gedeon Richter), Diclofenac (Diklak, Hexal AG), Metamizol (Metamizole Sodium, Sopharma).

2.2. Химични съединения:

Formalin (Sigma), Carrageenan (Fluka), Pentobarbital natrii (Sigma), Lipopolysaccharide (Sigma Aldrich).

3. Експериментални методи

3.1. Ноцицептивни тестове

3.1.1. Тест „гореща плоча“

Използвахме апарата HOT/COLD PLATE (Ugo Basile, Italy) с гореща повърхност с температура $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Отчита се латентното време, определено като периода между момента на поставяне на животното върху горещата плоча до момента, в който оближе една от задните си лапи, направи опит за изскачане от цилиндъра или реагира с вокализация. За да се избегне увреждане на тъканите, максималният престой върху плочата (cut-off time) е 30 секунди. Критерият за аналгетична активност е удължаване на нормалното реакционно време при опитните животни в сравнение с контролата.

3.1.2. Аналгезиметър тест

Използва се апарат – аналгезиметър (Ugo Basile, Italy). Прилага се механичен болков стимул. Ноцицептивният праг се измерва като се прилага натиск върху една от задните лапи на плъха. Силата на натиска е калибрирана в 10 гр/см при максимална сила 250 грама. Отчита се в условни единици (сантиметри) силата на натиска, при която животното отдръпва тестираната лапа. Максималният възможен натиск е при 25 см.

3.1.3. Формалинов тест

В една от задните лапи на плъха се инжектира интраплантарно по 0,1 мл 2% воден разтвор на формалин. Отчита се в секунди времето на близане на лапата за първите 10 минути и между 20 – 30 минута. Критерият за аналгетично действие е намаляването на времето за облизване на лапата при опитните животни в сравнение с контролата.

3.2. Методи за изследване на противовъзпалително действие

3.2.1. Карагенин-индуцирано възпаление

Използва се апарат плетизмометър (Ugo Basile, Italy). Преди третирането се измерва обема на задната дясна лапа на животните от всички групи. След това в задната дясна лапа на всички животни се инжектира 0,1 мл от 1% разтвор на карагенин в 0,9% натриев хлорид за предизвикване на карагенинов оток. Непосредствено след инжектирането на карагенин, животните от контролната група се инжектират интраперитонеално с 0,1 мл 0,9% разтвор натриев хлорид; втората група се инжектират с диклофенак в доза 25 мг/кг интраперитонеално, а на животните от другите опитни групи се въвеждат интраперитонеално изследваните вещества. В апарат плетизмометър (Ugo Basile) се отчита обемът изместена течност от задната дясна лапка на плъха на втория, третия и четвъртия час след третирането с карагенин. Изчислява се разликата в мл между обема на третираната с карагенин задна дясна лапа на втория, третия и четвъртия час (V_t) и обема на задна дясна лапа на всяко опитно животно преди третирането (V_0). Прилага се формула за изчисляване на процента на инхибиране на възпалението.

3.2.2. Липополизахарид-индуцирано възпаление

Използва се липополизахарид (LPS) на E.coli щам B:055. Инжектира се интраперитонеално еднократно в доза 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ на плъховете от контролната група и експерименталните групи с многократно третиране. Четири часа след инжектирането на LPS беше събрана кръв за имунологични изследвания след хиперемия на латералните кръвоносни съдове на опашката на животните. За целта животното се фиксира и опашката се потапя в съд с топла вода с температура около 40°C за 3 – 4 минути. Кръвта беше събрана в моновети и центрофугирана при 3000 оборота/минута в продължение на 10 минути непосредствено след събиране на пробите. Полученият серум беше съхраняван при -80°C в нискотемпературен фризер (SANYO) в Катедрата по микробиология и имунология при МУ – Пловдив в продължение на един месец до измерване концентрацията на цитокините.

Про-инфламаторните цитокини TNF- α и IL-6 бяха изследвани в серум от плъхове с LPS-индуцирано възпаление. Бяха използвани готови търговски китове за плъши серум за TNF- α и IL-6 съответно: Rat TNF- α ELISA KIT Diaclone (Cat. No: 865.000.096; годност 2016-09; няма

референтни граници;) Rat IL-6 ELISA KIT Diaclone (Cat.No: 670.010.096; годност 2016-08; няма референтни граници).

Метод: Ензимно-свързан имуносорбентен тест *ELISA*

Принцип на метод: Всички процедури по ELISA теста са извършени при стриктно спазване на инструкциите за работа с китовите на производителя.

За количествено изследване на цитокина TNF- α серумите от плъхове, вътрешните контроли и стандартите на теста след разреждане се накапваха в обем 100 μ l за всяка ямка върху плаката. След инкубация и измиване се поставяше конюгат в обем 50 μ l Biotinylated anti rat TNF- α към всички ямки (второ антивидово антитяло) за образуване на комплекс с цитокина. Следваше второ промиване за отстраняване на несвързания конюгат. Прибавян беше ензим в обем 100 μ l Streptavidin – HRP към всички ямки и съответния му хромогенен субстрат в обем 100 μ l TMB Substrate Solution за настъпване на цветна реакция, маркираща наличие на цитокина. Абсорбцията, която е пропорционална на цитокиновата концентрация, се измерваше колориметрично на ELISA рийдър TECAN при дължина на вълната 450 nm. Чрез построяване на стандартни криви се определяше концентрацията на всеки от цитокините в pg/ml.

За количествено изследване на цитокина IL-6 серумите от плъхове и вътрешните контроли се накапваха след разреждане в обем 50 μ l за всяка ямка върху плаката. Стандартите се накапваха след съответното разреждане в обем 100 μ l за всяка ямка върху плаката. След инкубация и измиване се поставяше конюгат в обем 50 μ l Biotin-Conjugate анти-плъши IL-6 моноклонално антитяло към всички ямки (второ антивидово антитяло) за образуване на комплекс с цитокина. Следваше второ промиване за отстраняване на несвързания конюгат. Прибавян беше ензим в обем 100 μ l Streptavidin – HRP към всички ямки и съответния му хромогенен субстрат в обем 100 μ l TMB Substrate Solution за настъпване на цветна реакция, маркираща наличие на цитокина. Абсорбцията, която е пропорционална на цитокиновата концентрация, се измерваше колориметрично на ELISA рийдър TECAN при дължина на вълната 450 nm. Чрез построяване на стандартни криви се определяше концентрацията на всеки от цитокините в pg/ml.

3.3. Модел на хронична невропатна болка.

Използвахме модел на невропатна болка чрез лигиране на n. ischiadicus (Bennett and Xie, 1998). Животните се анестезират чрез

интраперитонеално въвеждане на пентобарбитал натрий в доза 50 мг/кг, което осигурява анестезия с продължителност 20 – 40 минути. Левият седалищен нерв се отпрепарира от околните тъкани и се правят две лигатури (всяка с по два възела) през 2 мм. Раната се дезинфекцира със сулфатазол прах и се зашива послойно. При sham контролата се извършва идентична дисекция на левия крак без да се лигира седалищния нерв.

4. In vitro изследване на про-инфламаторни цитокини

Про-инфламаторните цитокини TNF- α и IL-6 бяха изследвани в серум от плъхове с LPS-индуцирано възпаление. Бяха използвани готови търговски китове за плъши серум за TNF- α и IL-6. Концентрацията на двата цитокина беше измерена чрез ELISA метод при стриктно спазване на инструкциите за работа с китовете на производителя (DIACLONE SAS, Besancon, France).

5. Статистическа обработка на получените резултати

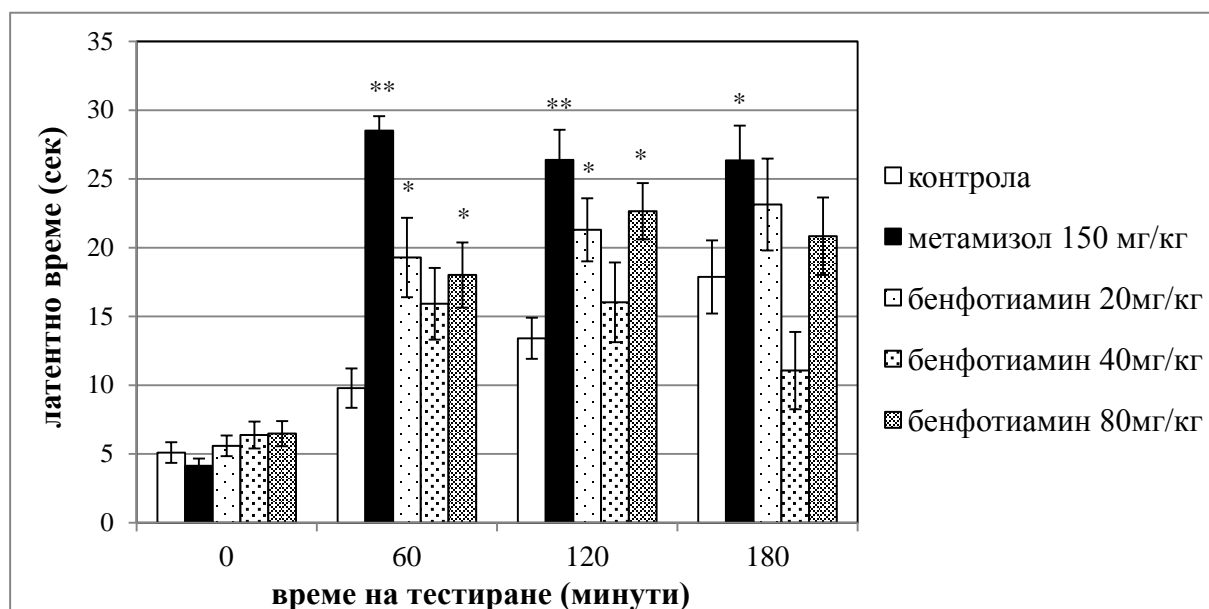
Получените данни от ноцицептивните и противовъзпалителните тестове бяха обработени статистически с програма SPSS 17.0. За всеки показател при всяка група бяха определени средната аритметична стойност (MEAN) и стандартната ѝ грешка (\pm SEM). Сравняването на резултатите за всеки показател спрямо съответната контролна група беше извършено с помощта на Independent Sample T test при степен на достоверност $P < 0,05$. За определяне на разпределението беше използван теста на Kolmogorov-Smirnov. При разпределение, различно от нормално, използвахме тест Mann-Whitney.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Изследване на аналгетична и противовъзпалителна активност на използваните вещества при еднократно прилагане.

1.1. Изследване на аналгетична и противовъзпалителна активност на бенфотиамин при еднократно прилагане.

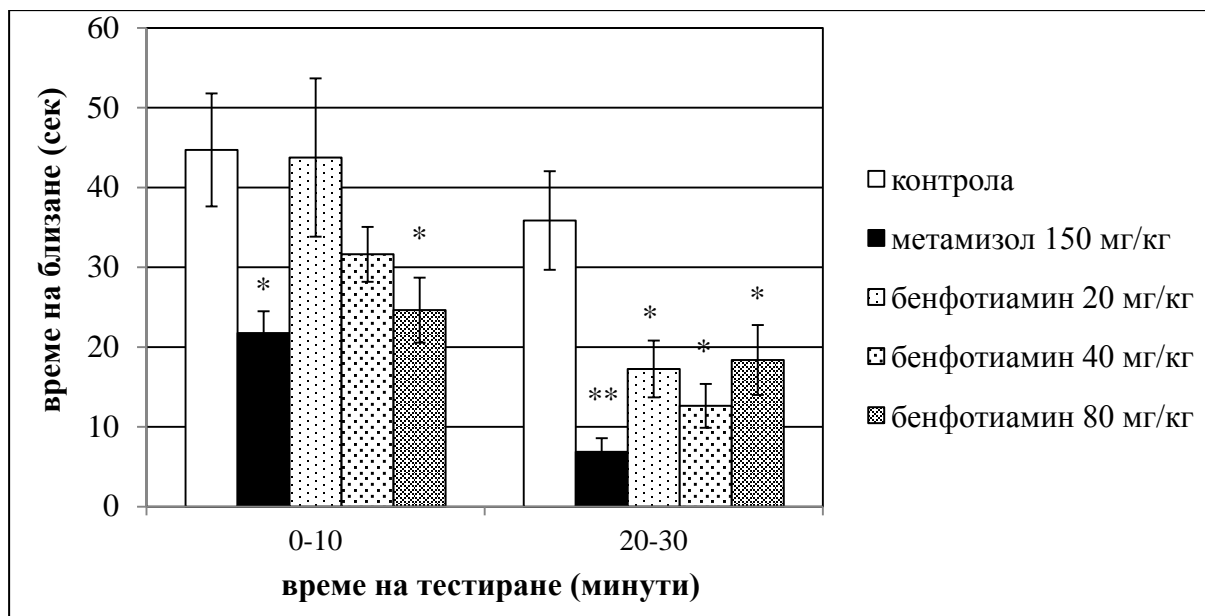
При теста с топлинен болков стимул бенфотиаминът в най-ниската (20 мг/кг) и най-високата доза (80 мг/кг) показва изразен антиноцицептивен ефект при еднократно приложение. Този ефект е статистически значим на 60-тата и 120-тата минута (фиг. 1).



Фигура 1. Ефект на бенфотиамин в дози 20, 40 и 80 мг/кг при тест „гореща плоча“ и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на същата минута; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

При теста с механичен натиск на лапата не установихме сигнификантен аналгетичен ефект при прилагане на бенфотиамин в трите изследвани дози при сравнение с контролата.

В двете фази на формалиновия тест, бенфотиаминът в доза 80 мг/кг т. м. показва статистически значим антиноцицептивен ефект, докато в останалите две дози този ефект се наблюдава само през късната фаза в сравнение с контролата (фиг. 2).



Фигура 2. Ефект на бенфотиамин в дози 20, 40 и 80 мг/кг при формалинов тест и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

При карагениновия модел на възпаление бенфотиаминът не показва достоверен антиинфламаторен ефект и при трите използвани дози.

Получените от нас данни за еднократно прилаган бенфотиамин показват, че той проявява аналгетичен ефект и е подходящ като допълваща терапия при болкови синдроми, предизвикани от топлинни или химични стимули. Получените от нас данни подкрепят тези на Moallem и съавтори (2008), които установяват, че тиаминът проявява изразен аналгетичен ефект при ноцицептивен тест с използване на топлинен стимул – „гореща плоча“. Тези автори наблюдават този ефект в по-високи дози тиамин – 50, 100 и 125 мг/кг. Като се има предвид, че бенфотиамин е липоразтворим аналог на тиамин с подобрен фармакокинетичен профил, не е очудващо, че проявява ефект в по-ниски дози. Sanchez-Ramirez GM и съавтори (2006) също потвърждават антиноцицептивния ефект на бенфотиамин при формалинов тест на интактни плъхове и при експериментален модел на захарен диабет, индуциран със стрептозотцин. Тези автори наблюдават ефектите през втората фаза на формалиновия тест при доза 300 мг/кг приложена перорално.

Противовъзпалителното действие на бенфотиамин не се доказва при карагениновия модел на възпаление. Следователно бенфотиаминът в по-слаба степен повлиява развитието на този тип възпаление. Възпалителният отговор, предизвикан от карагенин, индуцира освобождаването на редица

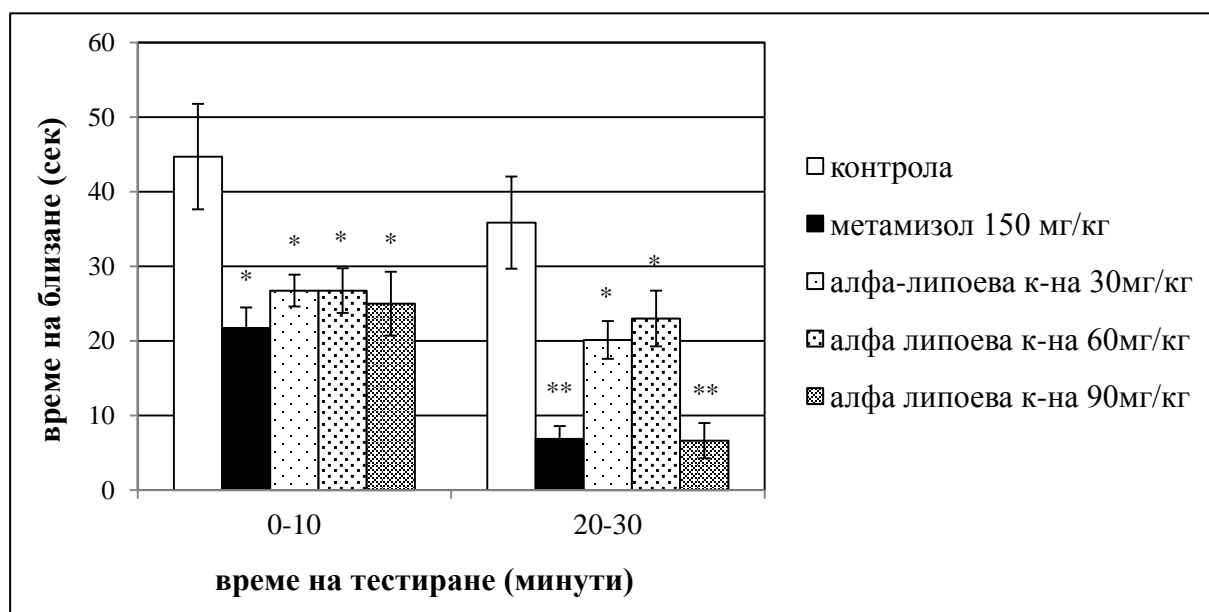
цитокини и хемокини, като IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 и азотен оксид (Tanaka et al., 2004). Shoeb и Ramana (2011) установяват, че бенфотиаминът намалява липополизахарид-индуцираната експресия на инфламаторни цитокини и хемокини в макрофагите. Същите автори посочват, че бенфотиаминът потиска липополизахарид-индуцираното освобождаване на свободни кислородни радикали и макрофагеалната смърт ин витро. Според тях антиинфламаторната активност на бенфотиаминът се дължи на потискане на фосфолипаза A2 и последващо инхибиране освобождаването на метаболити на арахидоновата киселина – PGE2, TXB, LTB4.

1.2. Изследване на аналгетична и противовъзпалителна активност на алфа липоева киселина (АЛА) при еднократно прилагане.

При теста „гореща плоча“ алфа-липоевата киселина показва статистически значим антиноцицептивен ефект само в доза 90 мг/кг, който беше регистриран на 60-та и 120-та минута.

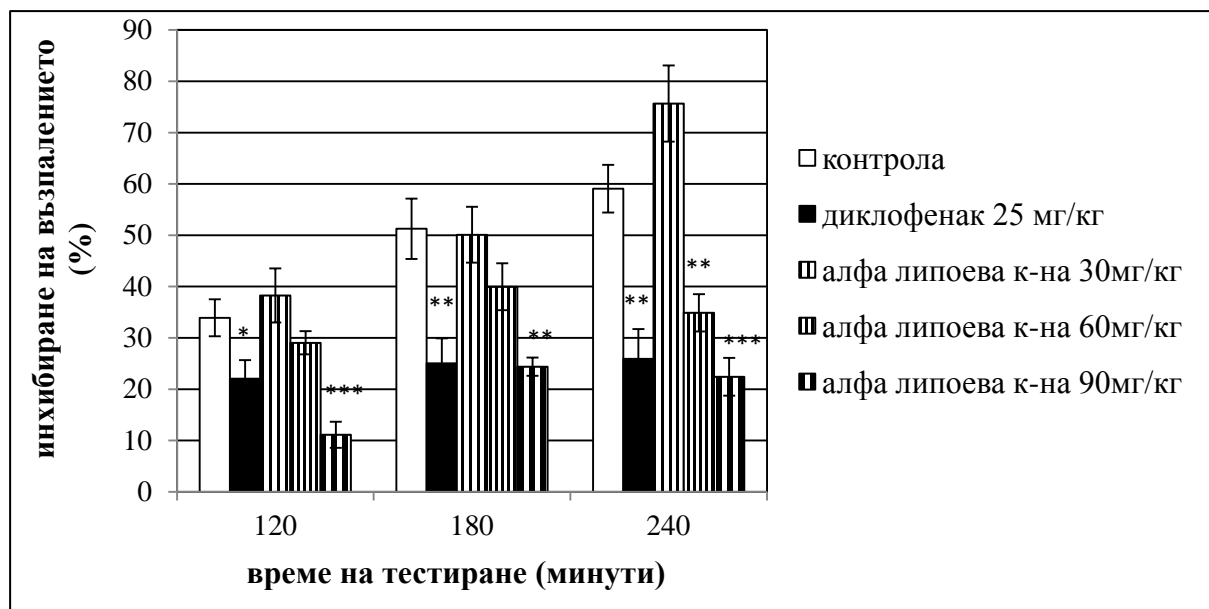
При аналгезиметър теста не се установи значима разлика между групите, третирани с алфа-липоева киселина в трите изследвани дози и контролната група и при четирите интервала на измерване.

При формалиновия тест групите, третирани с алфа-липоева киселина в трите изследвани дози намалиха статистически достоверно времето на близане на лапата както в ранната, така и в късната фаза на теста (фиг. 3).



Фигура 3. Ефект на алфа-липоева киселина в дози 30, 60 и 90 мг/кг при формалинов тест и еднократно третиране; *p < 0,05 при сравнение със съответната контрола; **p < 0,01 при сравнение със съответната контрола.

Алфа-липоевата киселина, приложена в двете по-високи дози (60 и 90 мг/кг) показва статистически значимо намаление на отока на лапата при карагениновия модел на възпаление в сравнение с контролната група. Нещо повече, антиинфламаторния ефект на алфа липоевата киселина е съизмерим с този на референтния препарат – диклофенак (фиг. 4).



Фигура 4. Ефект на алфа-липоева киселина в дози 30, 60 и 90 мг/кг при карагенинов модел на възпаление и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола и *** $p < 0,001$ при сравнение със съответната контрола.

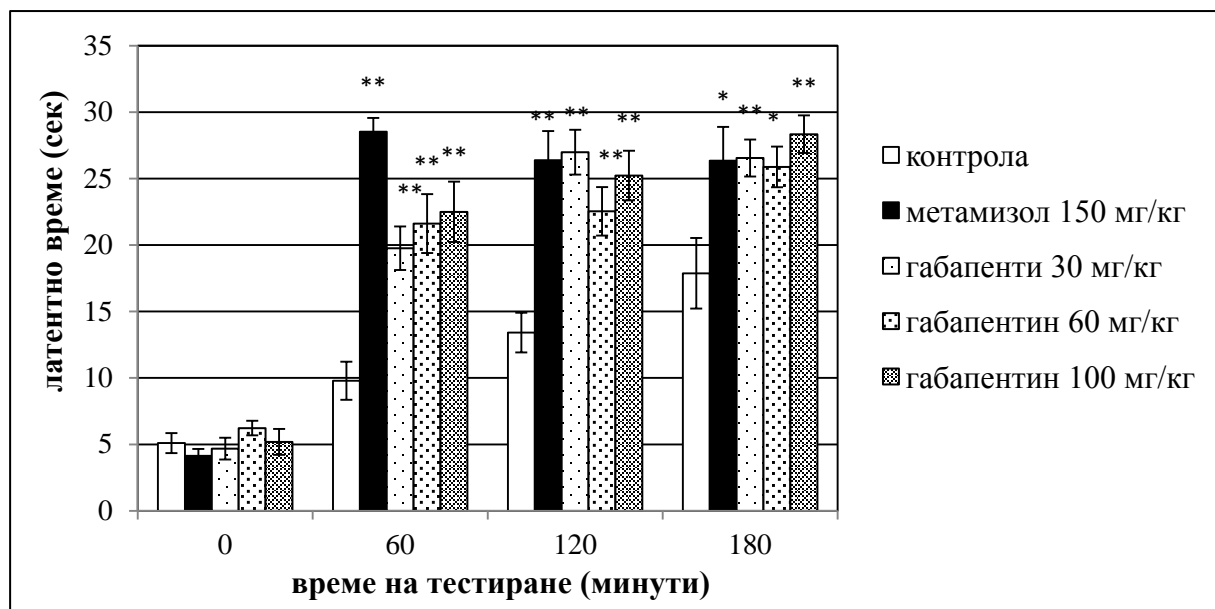
Обобщените резултати от трите ноцицептивни теста ни позволяват да заключим, че алфа липоевата киселина е ефективен аналгетик при болки от термичен и химичен произход. Предполага се, че алфа липоевата киселина модулира специфични йонни канали, за да упражни аналгетичен ефект (Lee et al, 2009). Тези йонни канали регулират невроналната възбудимост на неврони, участващи в болковите пътища. Предполага се, че Т-тип калциеви канали в ноцицептори на дорзалните спинални ганглии функционират като усилващи сигналите при остри болкови реакции. Авторите предполагат, че АЛА може да упражнява аналгетичен ефект като модулатор на тези Т-тип калциеви канали. Вероятно това е и механизмът на наблюдавания аналгетичен ефект и в нашите експерименти.

Алфа-липоевата киселина показва достоверен продължителен антиинфламаторен ефект при карагениновия модел на възпаление при двете по-високи дози (30 и 60 мг/кг) при еднократно третиране. Наблюдава се тенденция към доза-ефект зависимост в противовъзпалителния ефект на

АЛА. Получените от нас резултати потвърждават тези на други автори за противовъзпалителна активност на АЛА при експериментални условия на индуциран с карагенин оток (Odabasoglu F et al, 2011). За разлика от опитите на посочените автори, ние установихме противовъзпалителна активност при използване на по-ниски дози алфа-липоева киселина.

1.3. Изследване на аналгетична и противовъзпалителна активност на габапентин при еднократно прилагане.

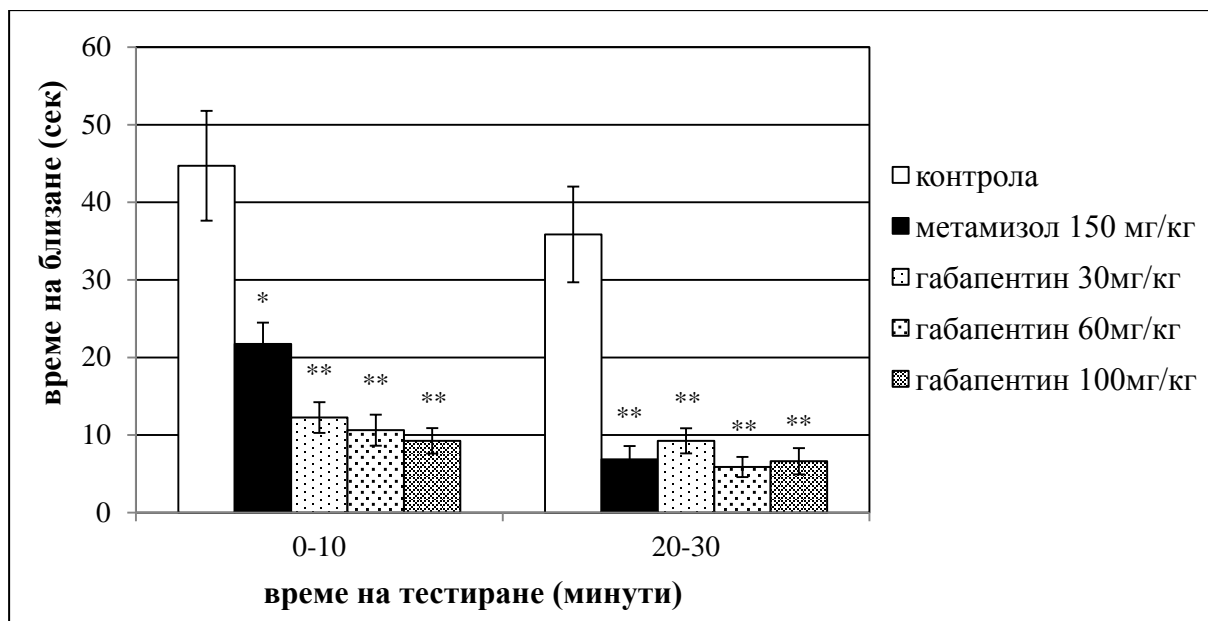
При теста „гореща плоча“ габапентинът в трите изпитвани дози показва статистическо значимо увеличение на латентното време на 60-та, 120-та и 180-та минута при сравнение с контролната група (фиг. 5).



Фигура 5. Ефект на габапентин в дози 30, 60 и 100 мг/кг при тест „гореща плоча“ и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на същата минута; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

При аналгезиметър тест габапентинът само в доза 60 мг/кг показва статистически значимо увеличение на силата на натиска, необходим за отдръпването на тестираната лапа при сравнение с контролната група на 120-та и 180-та минута в сравнение с контролата.

При теста с химичен болков стимул при всички изследвани дози габапентин се отчита аналгетичен ефект и в двете фази на формалиновия тест (фиг. 6).



Фигура 6. Ефект на габапентин в дози 30, 60 и 100 мг/кг при формалинов тест и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

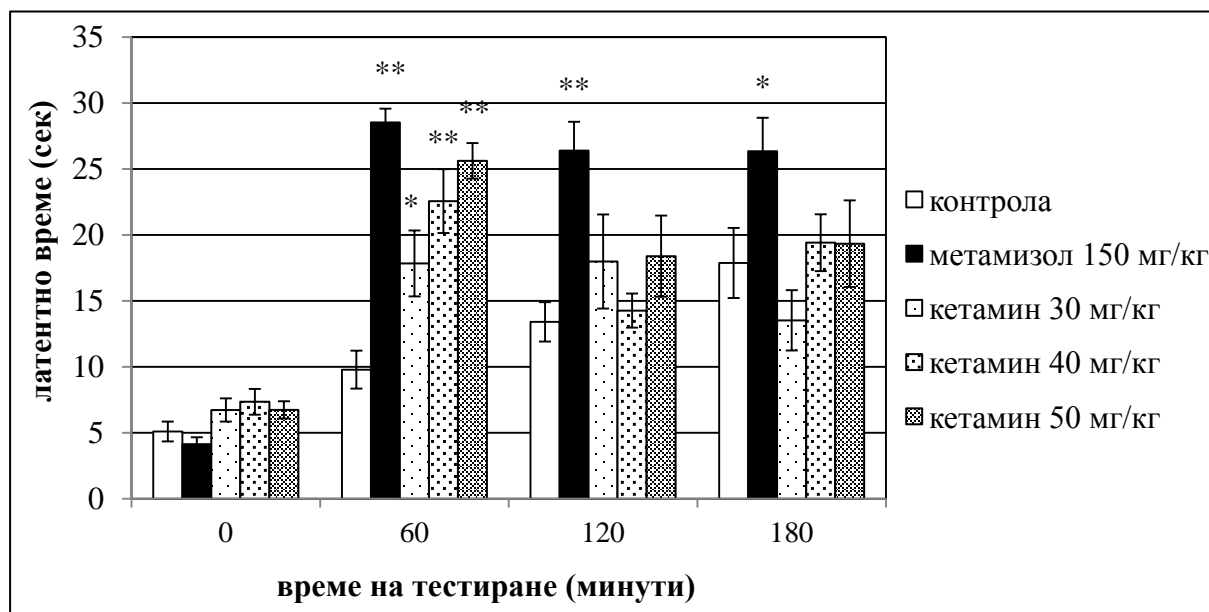
При модела на карагенин-индуцирано възпаление габапентинът в доза 100 мг/кг показва достоверен антиинфламаторен ефект при еднократно третиране. Този ефект се регистрира на 120-та и 240-та минута.

Получените от нас данни за аналгетичната активност на габапентин се подкрепят от тези на Kılıc и съавтори (2012), които установяват, че габапентинът проявява изразен противоболков ефект при ноцицептивните тестове – „гореща плоча“, „tail clip“, „tail flick“. Те установяват, че комбинираното приложение на габапентин и ципрохептадин в доза 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ като периферен 5-HT₂ антагонист засилва централния противоболков ефект на габапентина, което предполага участие на супраспинални серотонинергични механизми в осъществяването на аналгетичното действие на габапентина. При други експериментални проучвания с използване на болкови модели се установява, че габапентинът намалява и хипералгезията (Bertrand Set al, 2001). Shimoyama N и съавт. (1997) също установяват антиноцицептивен ефект на габапентина при формалинов тест, при интратекално въвеждане на габапентин в дози от 6 до 200 микрограма на плъх. В достъпната ни литература не открихме данни за антиинфламаторна активност на габапентин при карагенин-индуцирано възпаление. Нашите резултати за първи път показват, че габапентин във висока доза, приложен еднократно проявява антиинфламаторен ефект при остро ексудативно възпаление. Нашите данни биха могли да имат

клинично приложение с цел оптимизиране терапията при остри възпалителни болкови синдроми.

1.4. Изследване на аналгетична и противовъзпалителна активност на кетамин при еднократно прилагане.

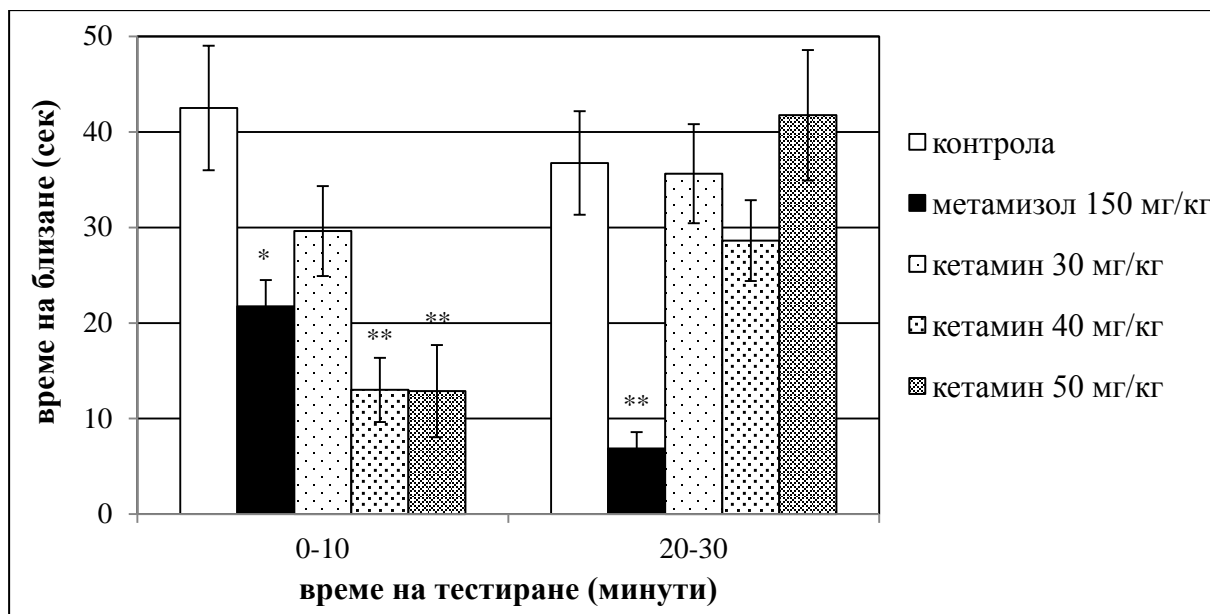
При теста „гореща плоча“ кетаминът показва ранен аналгетичен ефект и при трите използвани дози (фиг. 7).



Фигура 7. Ефект на кетамин в дози 30, 40 и 50 мг/кг при тест „гореща плоча“ и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на същата минута; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

При теста с механичен болков стимул кетаминът в най-високата доза (50 мг/кг) показва ранен и продължителен аналгетичен ефект.

При формалиновия тест кетаминът в дози 40 мг/кг и 50 мг/кг показва статистически значимо намаление на времето за близане на лапата само в ранната фаза на теста в сравнение с контролата (фиг. 8).



Фигура 8. Ефект на кетамин в дози 30, 40 и 50 мг/кг при формалинов тест и еднократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

При карагениновия модел на възпаление кетаминът в дози 30, 40 и 50 мг/кг не показва достоверен антиинфламаторен ефект.

Получените от нас резултати за противоболков ефект на кетамин подкрепят тези на Swartjes M и съавт. (2011), които установяват, че кетаминът проявява изразена аналгетична активност при друг ноцицептивен тест с използване на топлинен стимул – инфрачервени лъчи. Посочените автори установяват този ефект при дози по-ниски от нашите – 7,5 мг/кг и 10 мг/кг, приложени еднократно. Romero TR и съавт. (2013) също потвърждават аналгетичния ефект на локално приложен кетамин при модел на хипералгезия, предизвикан от интраплантарно инжектиран простагландин E2. Нашите резултати позволяват заключението, че кетаминът може да бъде надежден аналгетик при болки, предизвикани с химични агенти веднага след настъпване на увредата.

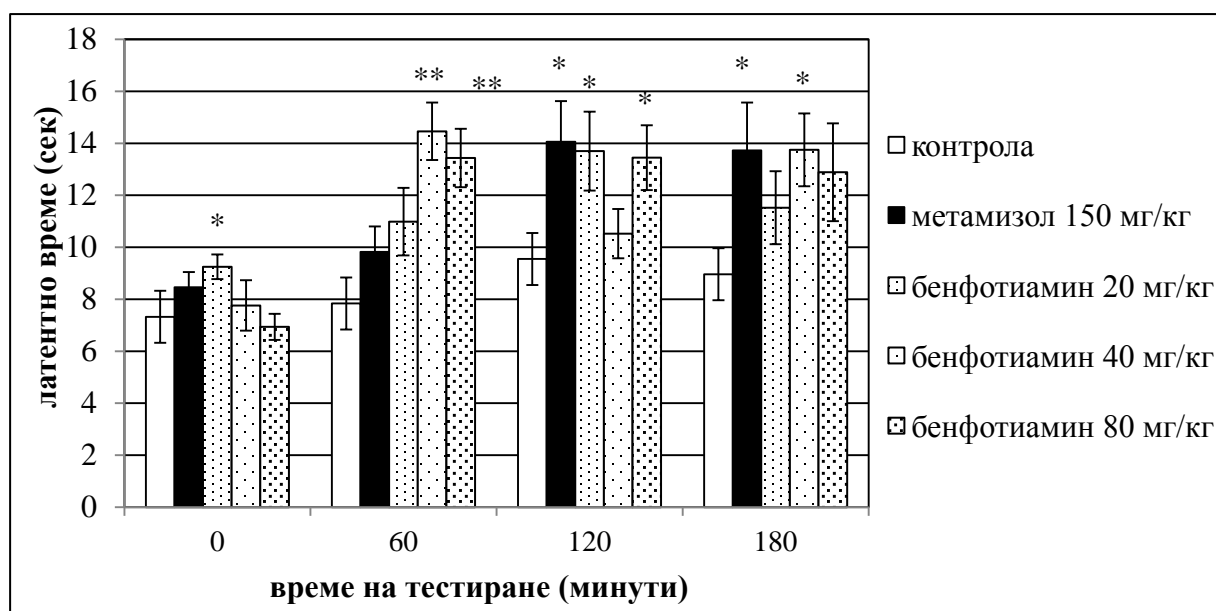
В настоящето изследване кетаминът при еднократно приложение не показва статистически значим противовъзпалителен ефект при карагениновия модел на възпаление. Редица експериментални изследвания установяват силен антиинфламаторен ефект на кетамин при различни модели на системно възпаление: ендотоксемия, сепсис и исхемия (Zhang Z, 2014). Липсата на ефект в нашите резултати не отхвърлят възможния противовъзпалителен ефект на кетамин. Бъдещи експерименти в тази

насока могат категорично да докажат или отхвърлят този ефект на кетамина при карагенинов модел на възпаление.

2. Изследване на аналгетична и противовъзпалителна активност на използваните вещества при многократно прилагане.

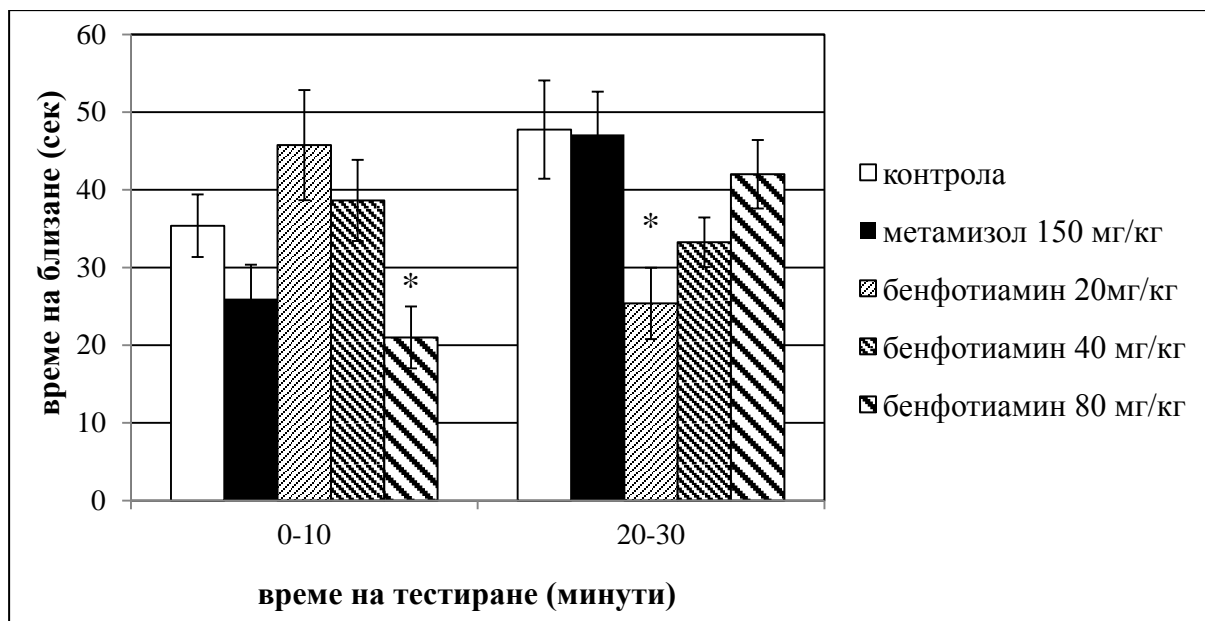
2.1. Изследване на аналгетична и противовъзпалителна активност на бенфотиамин при многократно прилагане.

При теста „гореща плоча“ и 14-дневно третиране бенфотиаминът в трите изследвани дози показва продължителен антиноцицептивен ефект (фиг. 9). При теста с механичен натиск на лапата бенфотиаминът прояви ранен и кратък аналгетичен ефект.



Фигура 9. Ефект на бенфотиамин в дози 20, 40 и 80 мг/кг при тест „гореща плоча“ и многократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на същата минута; ** $p < 0,01$ при сравнение с контролата на същата минута.

При формалиновия тест бенфотиаминът в доза 20 мг/кг показва достоверен аналгетичен ефект само през късната фаза на теста. Приложен в доза 80 мг/кг понижи достоверно проследявания показател само в ранната фаза на теста (фиг. 10).



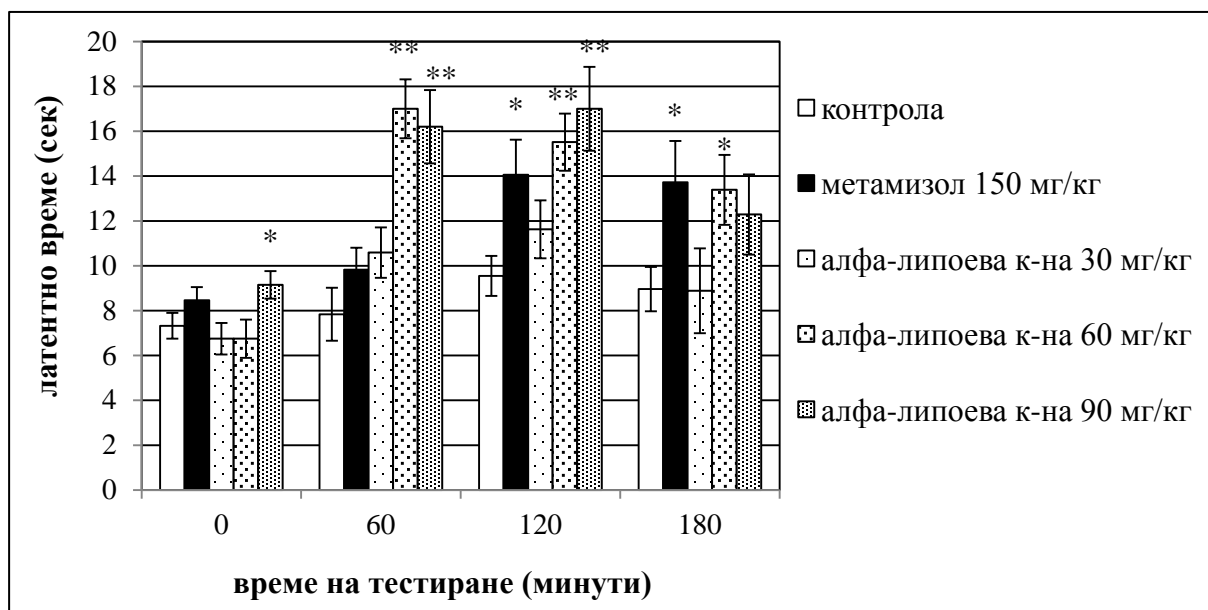
Фигура 10. Ефект на бенфотиамин в дози 20, 40 и 80 мг/кг при формалинов тест и многократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола.

Бенфотиаминът в трите изследвани дози (20, 40 и 80 мг/кг) не намали статистически значимо карагениновия оток на лапата в сравнение с контролата и при трите тествания при този модел на възпаление.

Резултатите от трите ноцицептивни теста и многократно прилагане на бенфотиамин ни дават основание да заключим, че бенфотиаминът може да се прилага в комбинираната терапия на ноцицептивната болка. Редица проучвания установяват антиноцицептивен ефект на тиамин при констрикторен тест с оцетна киселина и формалинов тест на мишки (Abacioglu et al, 2000; Franca et al, 2001). Установено е, че пероралното приложение на бенфотиамин сигнификантно повишава нивата на тиамин, тиаминмонофосфат и тиамин дифосфат в плазма, черен дроб, но не и в мозъчната тъкан. Това е в съгласие с известния фармакологичен профил на бенфотиамин, а именно благоприятен ефект при увреждане на периферните нерви и липса на специфичен ефект върху централната нервна система.

Противовъзпалителното действие на бенфотиамин не се доказва в нашите експерименти. Бенфотиаминът при 14-дневно приложение не промени карагенин-индуцирания оток. За разлика от нас, Yadav и съавт. (2009) установяват, че бенфотиаминът проявява антиоксидативна и противовъзпалителна активност при ендотоксин-индуциран увеит на плъхове.

2.2. Изследване на аналгетична и противовъзпалителна активност на алфа липоева киселина при многократно прилагане.

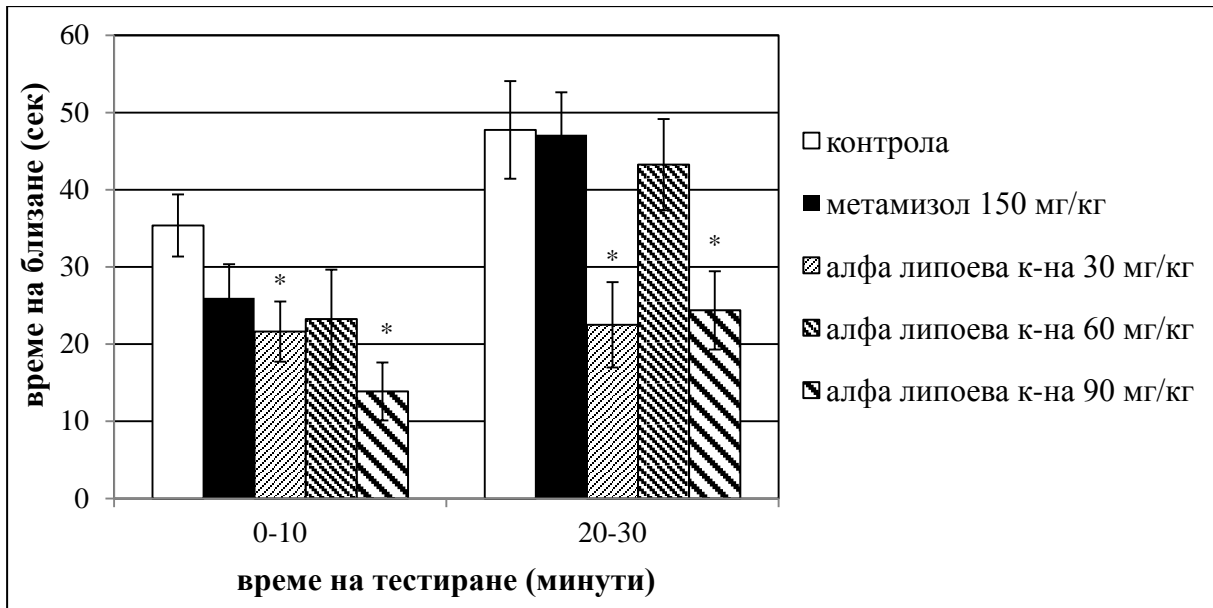


Фигура 11. Ефект на алфа-липоева киселина в дози 30, 60 и 90 мг/кг при тест „гореща плоча“ и многократно третиране; * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

При теста „гореща плоча“ в условия на многократно третиране, алфа липоевата киселина показва достоверен антиноцицептивен ефект при дози 60 и 90 мг/кг (фиг. 11).

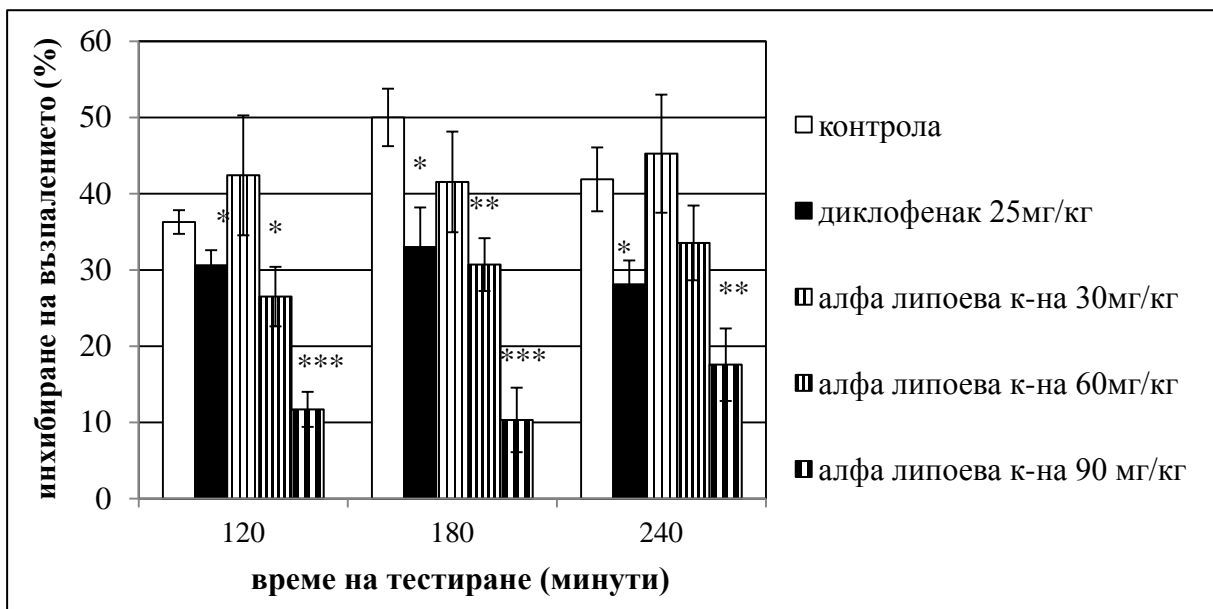
При теста с механичен натиск на лапата и 14-дневно третиране с алфа-липоевата киселина регистрирахме ранен и кратък аналгетичен ефект.

При теста с химичен болков стимул алфа-липоевата киселина в дози 30 и 90 мг/кг намали статистически значимо времето за близане на лапата и в двете фази на теста в сравнение с контролата (фиг. 12).



Фигура 12. Ефект на алфа-липоева киселина в дози 30, 60 и 90 мг/кг при формалинов тест и многократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола.

При карагениновия модел на възпаление алфа липоевата киселина в дози 60 и 90 мг/кг показва достоверен антиинфламаторен ефект. Този ефект се регистрира при трите тествания при най-високата доза (фиг. 13).

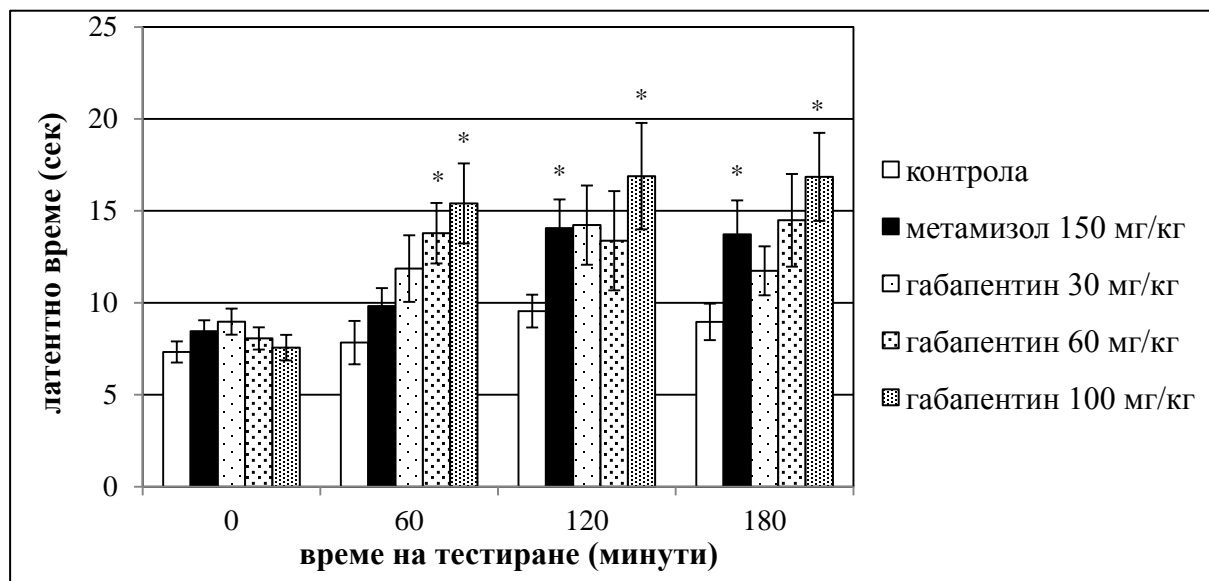


Фигура 13. Ефект на алфа-липоева киселина в дози 30, 60 и 90 мг/кг при карагенинов модел на възпаление и многократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола и *** $p < 0,001$ при сравнение със съответната контрола.

Резултатите от нашето проучване върху аналгетичния и противовъзпалителен ефект на алфа липоевата киселина в условията на многократно приложение показват, че АЛА проявява значим аналгетичен и противовъзпалителен ефект. Експериментални изследвания установяват, че противовъзпалителните качества на АЛА се дължат на позитивния ѝ ефект върху антиоксидантната система (van den Berg R et al, 2001; Cho YS et al, 2004). Моделът на карагенин-индуцираното възпаление на лапата е широко използван за определяне на острата фаза на възпаление. Хистамин, 5-хидрокси триптамин и брадикинин са медиаторите, открити в ранната фаза на карагенин-индуцираното възпаление, докато простагландините се установяват в късната фаза на възпалителната реакция. Приложението на карагенин активира макрофагите и полиморфонуклеарните левкоцити, които продуцират свободни кислородни радикали и освобождават проинфламаторни медиатори като TNF- α и IL-6. Нашите резултати подкрепят косвено тази хипотеза, тъй като АЛА показва добре изразен ефект върху този модел както при еднократно, така и при многократно прилагане.

2.3. Изследване на аналгетична и противовъзпалителна активност на габапентин при многократно прилагане.

При теста с топлинен болков стимул регистрирахме статистически значим антиноцицептивен ефект при двете по-високи дози (60 и 100 мг/кг) габапентин (фиг. 14).

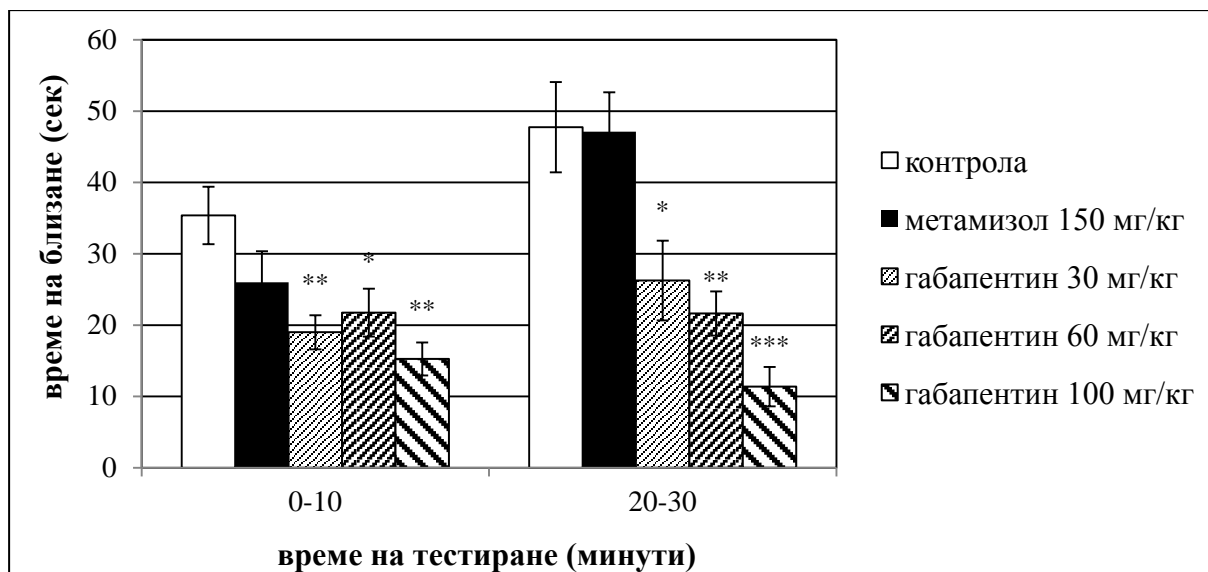


Фигура 14. Ефект на габапентин в дози 30, 60 и 100 мг/кг при тест „гореща плоча“ и многократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение с контролата на същата минута.

При аналгезиметър теста габапентинът показва ранен и кратък аналгетичен ефект.

При формалиновия тест при всички изследвани дози габапентин се отчита достоверен аналгетичен ефект и в двете фази на теста (фиг. 15). Ноцицептивният отговор при теста с формалин е двуфазен. Наблюдава се начален остър период с продължителност около 10 минути – фаза 1 и регистрираните поведенчески промени се дължат на остро активираните от формалина първични аферентни нервни терминали. Втората фаза на формалиновия тест отразява централната сенситизация на невроните в задния рог и периферна сенситизация на ноцицепторите от предизвиканата от формалина локална възпалителна реакция (Herrero, 2000). Получените от нас резултати показват, че габапентинът блокира както ноцицептивните стимули, предавани чрез ноцицепторите и първичните аферентни неврони, така и спиналните ноцицептивни механизми. Очувствяването на заднороговите неврони в гръбначния мозък включва активиране на NMDA и NK-1 рецепторите с последващ инфлукс на Ca^{2+} йони вътреклетъчно и активиране на вторични невромедиаторни системи. Установено, че габапентинът намалява Ca^{2+} инфлукс в пресинаптичните нервни терминали и инхибира освобождаването на възбудни аминокиселини (Fink K et al, 2000). Предполага се, че механизмът на аналгетичното действие на габапентина се реализира чрез блокиране на $\alpha 2\delta$ субединицата на волтаж зависимите калциеви канали (Field MJ, 2000). В нашите експерименти установихме антиноцицептивен ефект на габапентина, дължащ се вероятно на блокиране на ноцицептивните стимули, предавани чрез болковите рецептори и първичните аферентни неврони.

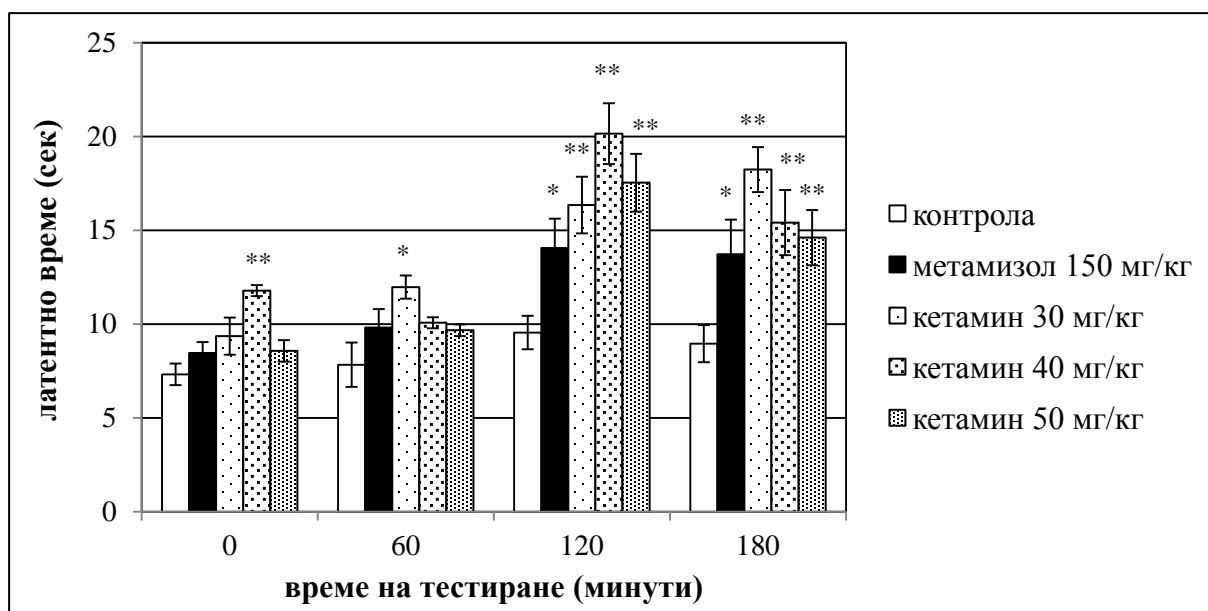
Габапентинът в трите изследвани дози (30, 60 и 100 мг/кг) не показва статистически значимо намаление на отока на лапата при карагениновия модел на възпаление.



Фигура 15. Ефект на габапентин в дози 30, 60 и 100 мг/кг при формалинов тест и многократно третиране; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ при сравнение със съответната контрола.

2.4. Изследване на аналгетична и противовъзпалителна активност на кетамин при многократно прилагане.

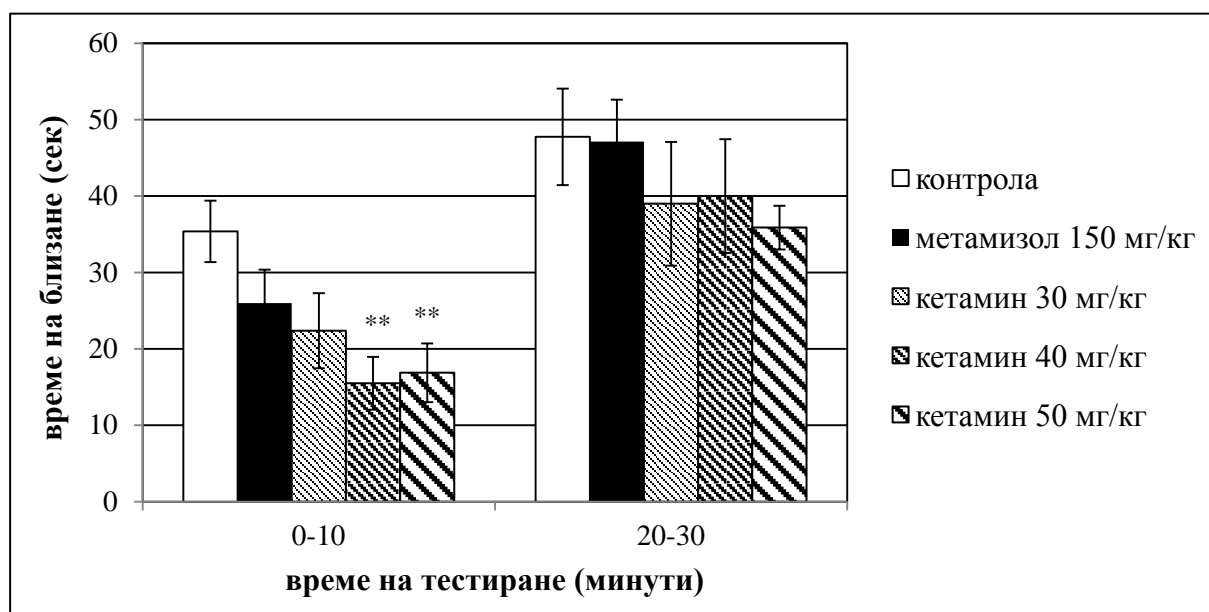
При теста „гореща плоча“ кетаминът показва изразен антиноцицептивен ефект и при трите изследвани дози (фиг. 16).



Фигура 16. Ефект на кетамин в дози 30, 40 и 50 мг/кг при тест „гореща плоча“ и многократно третиране; * $p < 0,05$ при сравнение със съответната контрола и ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола

При теста с механичен натиск върху лапата кетаминът показва ранен и кратък аналгетичен ефект.

При теста с химичен болков стимул кетаминът, приложен в двете повисоки дози (40 и 50 мг/кг) показва изразен аналгетичен ефект само през ранната фаза на теста (фиг. 17). За разлика от нас, Vulutcu и съавтори (2002) установяват съществен антиноцицептивен ефект при еднократно системно интратекално прилагане на кетамин само през късната фаза на формалиновия тест. Вероятно тази разлика се дължи на различния начин на прилагане на кетамин в нашите експерименти.



Фигура 17. Ефект на кетамин в дози 30, 40 и 50 мг/кг при формалинов тест и многократно третиране; ** $p < 0,01$ при сравнение със съответната контрола.

При карагениновия модел на възпаление кетаминът и в трите изследвани дози не показва достоверен антиинфламаторен ефект при многократно прилагане.

Аналгетичният ефект на кетамина е установен при постоперативна болка при редица клинични и експериментални проучвания (Wang N, 2015; Koizuka S, 2005). Мета анализ на клинични проучвания показва ползата от допълнителното прилагане на кетамин за контролиране на ракова болка при деца и възрастни пациенти (Bredlau AL, 2013).

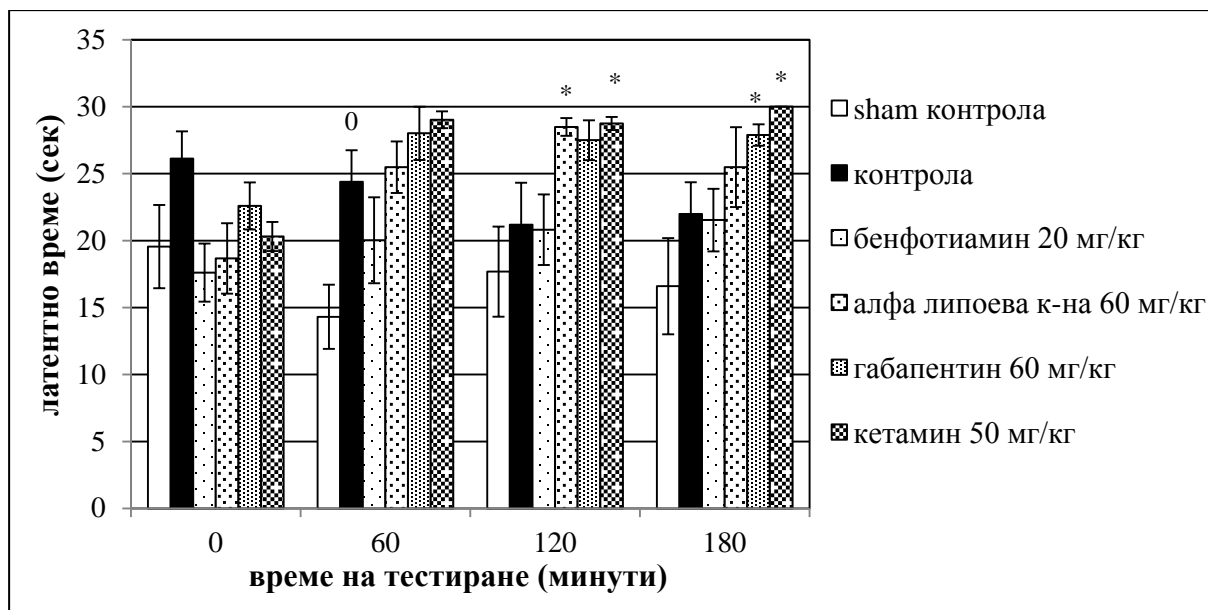
Нашите данни за аналгетичния ефект на кетамина ни позволяват да заключим, че кетаминът може да е надежден аналгетик в комбинираната терапия на болка от различен произход.

3. Изследване на аналгетична активност на използваните вещества при модел на невропатна болка.

3.1. Изследване на аналгетична активност на използваните вещества при тест „гореща плоча“.

При модел на невропатна болка бенфотиаминът в използваната от нас доза (20 мг/кг) не показва достоверен антиноцицептивен ефект при теста с топлинен болков стимул (фиг. 18). Wang и съавтори (2005) изследват ефекта на тиамин при два модела на невропатна болка-притискане на дорзалния спинален ганглий и налагане на лигатура на n. ischiadicus. Те наблюдават подобряващ ефект на тиамина, въведен интраперитонеално в дози 5-100 мг/кг при термална хипералгезия.

При модел на невропатна болка и тест „гореща плоча“ алфа-липоевата киселина показва късен и продължителен антиноцицептивен ефект при изследваната от нас доза (фиг. 18). Травматичното увреждане на n. ischiadicus при плъхове е често използван модел за изучаване увреждането на периферните нерви. Този модел води до оксидативен стрес с образуване на реактивни кислородни радикали и намаляване на антиоксидантната защита. Алфа-липоевата киселина е мощен липофилен антиоксидант ин виво и ин витро и играе основна роля като кофактор в много митохондриални реакции. Експериментални проучвания сочат, че при увреждане на гръбначния мозък се наблюдава липидно перокисление, което по автокаталитичен механизъм води до оксидативна деструкция на клетъчните мембрани (Adibhatla RM et al, 2008). Toklu и съавт. (2010) установяват при плъхове с модел на гръбначно-мозъчна увреда намаляване нивото на глутатиона, а интраперитонеалното приложение на алфа-липоевата киселина в доза 50 мг/кг увеличава нивото на глутатиона и намалява образуването на реактивни свободни радикали, измерено чрез хемилуминисцентна техника.



Фигура 18. Ефект на бенфотиамин, алфа-липоева к-на, габапентин и кетамин при тест „гореща плоча“ и модел на невропатна болка. ⁰p < 0,01 в сравнение със sham контролата; *p < 0,05 в сравнение с контролата.

При теста „гореща плоча“ габапентинът в доза 60 мг/кг показва късно настъпващ антиноцицептивен ефект в изследваната доза. Този ефект се регистрира на 180-тата минута след въвеждането (фиг. 18). Подобни на нашите са резултатите на Самага С и съавтори (2013), които регистрират аналгетичен ефект на габапентина при плъхове със същия модел на невропатна болка при тест с топлинен болков стимул. Други автори (Arcos M, 2013) не установяват аналгетичен ефект на габапентина при модел на термична ноцицепция при плъхове с увреда на n. ischiadicus.

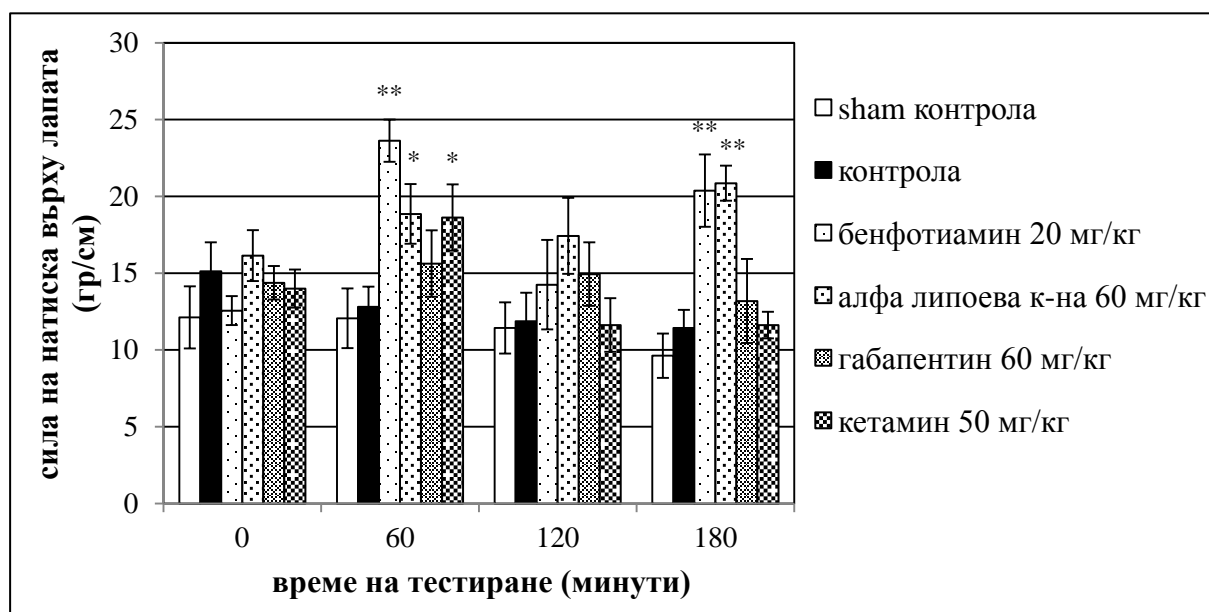
При модел на невропатна болка кетаминът прояви късен и продължителен обезболяващ ефект при теста „гореща плоча“ (фиг. 18). В литературата съществуват множество данни за участието на NMDA рецепторите в патогенезата на болката при увреждане на периферните тъкани или нерви (Chizh and Eide, 2002; Chizh and Headley, 2005). NMDA рецептори се откриват в периферните миелинизирани и немиелинизирани соматични нервни влакна, в гръбначния и главния мозък. Въпреки, че NMDA антагонисти са показали ефикасност при експериментални модели, както и при пациенти с хронична болка, клиничната им употреба за лечение на невропатна болка е ограничено поради страничните им ефекти като седация, халюцинации, атаксия. Други автори установяват, че въвеждането на краткочействащият NMDA антагонист кетамин намалява

развитието на толерантност към опиати, състояние, свързано с развитието на NMDA рецепторна хипералгезия (Danysz et al., 2005).

3.2. Изследване на аналгетична активност на използваните вещества при тест „аналгезиметър“.

При модел на невропатна болка бенфотиаминът в използваната от нас доза показва ранен и продължителен антиноцицептивен ефект при теста с механичен болков стимул (фиг. 19). Нашите данни се потвърждават и от други автори, които установяват аналгетичен ефект на бенфотиаминът при модел на алодиния чрез лигиране на гръбначно-мозъчни нерви на ниво L5 и L6 при плъхове и при тест с механичен натиск на лапата (Sanchez-Ramirez G et al, 2006).

При теста с механичен натиск на лапата и модел на невропатна болка се установи добре изразен ранно настъпващ и продължителен антиноцицептивен ефект на алфа-липоевата киселина (фиг. 19). Глутатионът и други антиоксиданти играят основна роля в спиране разпространението на свободно-радикаловите реакции, които са резултат на липидната пероксидация. Повишеното ниво на глутатиона в тъканите е важен защитен механизъм срещу свръхпродукцията на свободни кислородни радикали. Биологичните ефекти на алфа-липоевата киселина са предимно свързани с нейните антиоксидантни свойства и способността ѝ да увеличава нивото на глутатиона.



Фигура 19. Ефект на бенфотиамин, алфа-липоева к-на, габапентин и кетамин при аналгезиметър тест и модел на невропатна болка. * $p < 0,05$ в сравнение с контролата; ** $p < 0,01$ в сравнение с контролата.

При ноцицептивния тест с механичен натиск на лапата в нашите експерименти габапентинът не показва статистически значим противоболков ефект (фиг. 19). За разлика от нас, Gustafsson H и съавтори (2003) установяват, че габапентина намалява механичната алодиния при мишки с модел на невропатия чрез фотохимична индуцирана исхемия на n. ischiadicus.

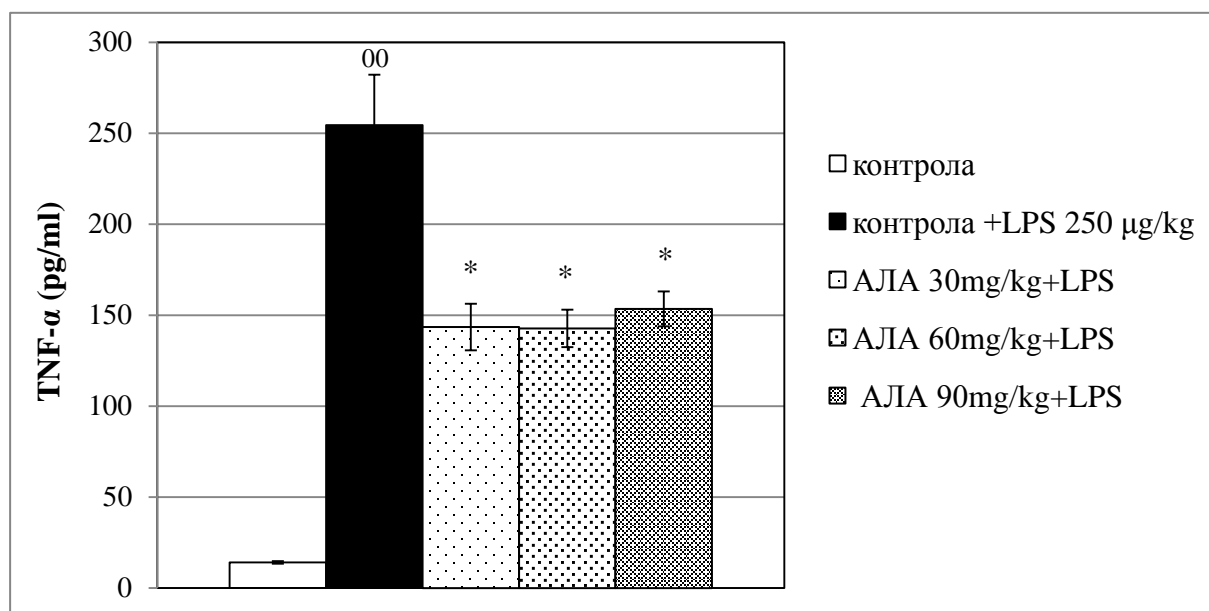
При ноцицептивния тест с механичен натиск на лапата, кетаминът показва ранен и кратък аналгетичен ефект (фиг. 19). Koizuka S. и съавт. (2005) установяват, че кетаминът намалява свръхчувствителността на невроните в ранния стадий при модел на постоперативна болка при плъхове. Същите автори установяват, че предтретирането с $\alpha 2$ -рецепторен или серотонинов рецепторен антагонист понижава ефекта на кетамина при този модел. Тези резултати предполагат, че активирането на моноаминергичните низходящи инхибиторни пътища заемат важно място в механизма на аналгетичния ефект на кетамина при този болков модел. Ние не можем да отхвърлим тази хипотеза.

4. Промени в серумните концентрации на TNF- α и IL-6 при липополизахарид-индуцирано възпаление и многократно прилагане на изследваните вещества.

При модел на липополизахарид-индуцирано възпаление, животните многократно третирани с бенфотиамин в най-висока доза показва статистически значимо понижение в серумното ниво на TNF- α . При същия модел на възпаление, бенфотиаминът в трите изследвани дози не промени статистически значимо серумното ниво на IL-6. Umesh Yadav и съавт. (2010) установяват, че бенфотиаминът предотвратява LPS индуцираните сигнални пътища, водещи до апоптична клетъчна смърт на миши макрофаги. Известно е, че LPS при свързване с неговия рецептор, TLR-4, иницира реакции на фосфорилиране и дефосфорилиране на различни кинази, което в крайна сметка води до активиране на транскрипционните фактори NF- κ B и AP-1 (Kim et al, 2006). Активирането на NF- κ B води до транскрипцията на различни възпалителни маркери, вкл. COX-2 и iNOS (Srivastava et al, 2009). Други автори (Bozic I et al, 2015) изследват и доказват противовъзпалителния ефект на бенфотиамина при LPS стимулирани миши BV-2 микроглиални клетки. Те установяват, че бенфотиаминът намалява продукцията на проинфламаторни медиатори като iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6 и повишава нивото на

противовъзпалителния IL-10 при ин витро опити с микроглиални клетъчни култури, стимулирани с LPS. Нашите експерименти с 14-дневно прилагане на бенфотиамин доказаха намаляването на продукцията на TNF- α под влияние на бенфотиамин, но не повлияване продукцията на IL-6. Вероятно това се дължи на сравнително краткото прилагане на бенфотиамин.

В настоящето проучване при многократно приложение на алфа липоева киселина върху плъхове, установихме значимо намаление на серумното ниво на TNF- α при LPS-индуцирано възпаление. При същия модел на възпаление не наблюдавахме статистически значимо намаление в нивото на другия проинфламаторен цитокин – IL-6, а в най-ниската използвана от нас доза – дори нарастване на концентрацията на IL-6 (фиг. 20).



Фигура 20. Серумно ниво на TNF- α при многократно третиране с алфа-липоева киселина. ⁰⁰p < 0,01 при сравнение с контролата; *p < 0,05 при сравнение с контролата + LPS.

Системното прилагане на LPS води до остро освобождаване на реактивни кислородни радикали (ROS), както и до увеличаване плазмените нива на TNF- α и NO. Тези резултати потвърждават признатите прооксидантни свойства на LPS (Victor VM, 2003).

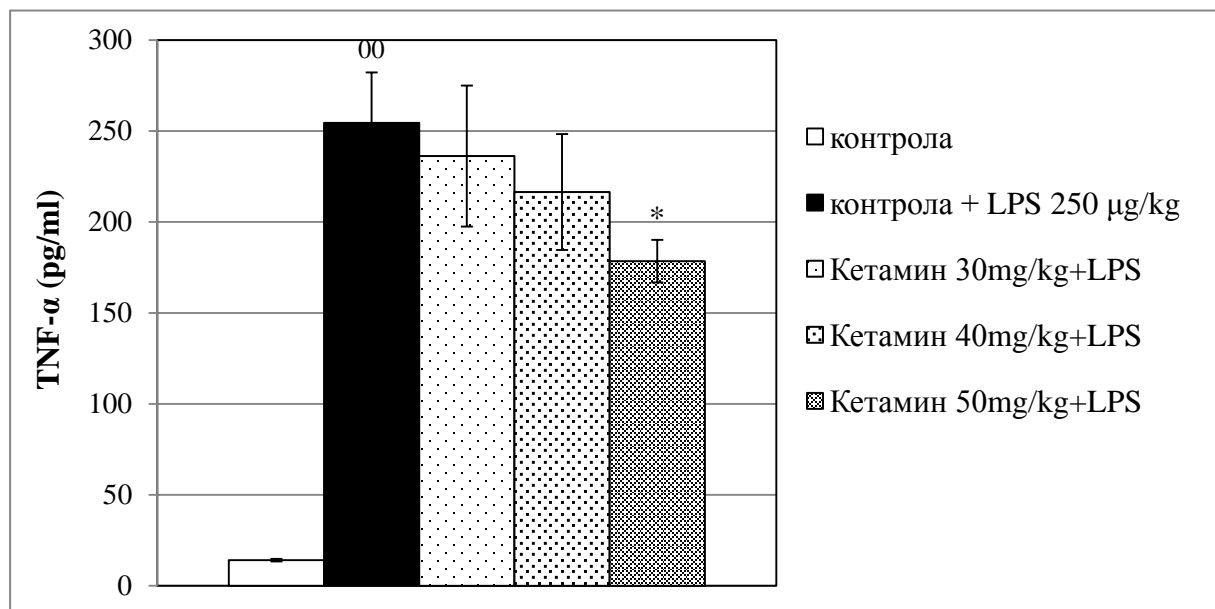
Благоприятните ефекти на алфа липоевата киселина върху нивата на TNF- α в нашите резултати може да се дължат на способността ѝ да модулира антиоксидант/прооксидантния метаболизъм. Алфа липоевата киселина, поради дитиоловата си природа, може да улавя редица ROS,

сред които хидроксилен радикал, супероксид анион и алкилов радикал. Все повече доказателства сочат, че ALA/DHLA свързват редица метални йони и по този начин намаляват метал-катализираните свободно-радикалови реакции (Shay et al, 2009). Установено е, че алфа липоевата киселина инхибира LPS-индуцираната експресия на клетъчни адхезионни молекули в различни видове клетки и животински модели (Skibska B, 2006). Cadirci и съавт. (2010) установяват намаление в серумното ниво на проинфламаторните цитокини TNF- α и IL-6 при експериментален модел на остро белодробно увреждане.

В нашите експерименти вероятно недостатъчно продължителното прилагане на алфа липоева киселина – само 14 дни не позволи значимо повлияване на нивата на IL-6.

В настоящето изследване след многократно третиране на животните с габапентин не установихме значима промяна в серумните нива на TNF- α и IL-6 спрямо контролната група при LPS-индуцирано възпаление.

При модел на LPS-индуцирано възпаление установихме доза-зависимо намаление в серумните нива на TNF- α при животните многократно третирани с кетамин, като статистическа значимост се наблюдава само при най-високата доза (фиг. 21).



Фигура 21. Серумно ниво на TNF- α при 14-дневно третиране с кетамин. ⁰⁰p < 0,01 при сравнение с контролата; *p < 0,05 при сравнение с контролата + LPS.

При същия модел на възпаление не установихме сигнификантни промени в стойностите на IL-6 при многократно третирани с кетамин

животни. Нашите резултати са в съответствие с литературните данни. TNF- α и IL-6 са основни възпалителни цитокини, продуцирани от макрофагите и участват в регулирането на имунния отговор, острата фаза на възпалението и хемопоезата (Wu, 2008). Ward JL et al (2011) при проучвания върху плъхове установяват, че кетаминът в субанестетични дози намалява серумните нива на IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α и IFN- γ при LPS-индуцирано възпаление. Същите автори съобщават, че при друг модел на възпаление – травматично мозъчно увреждане, кетаминът не оказва влияние върху увеличените мозъчни концентрации на провъзпалителните цитокини. При експериментален модел на сепсис у гризачи, Yu et al (2007) съобщават, че кетамин, приложен интравенозно намалява повишената серумна концентрация на TNF- α , но не оказва влияние върху серумното ниво на IL-6.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Болката е най-ранният симптом, който кара пациента да потърси лекарска помощ. Въпреки това, тя остава все още недостатъчно проучена и лечението ѝ, особено на хроничната болка е трудно. В последните години все повече се обръща внимание на комбинираното лечение на болката със средства, чийто основен механизъм на действие не е аналгетичния.

Установените от нас експериментални данни можем да обобщим в няколко направления: 1/ изследване на аналгетично и противовъзпалително действие на бенфотиамин, алфа-липоева киселина, габапентин и кетамин при еднократно и многократно приложение, 2/ изследване на техните ефекти върху модел на хронична невропатна болка и 3/ изследване промените в серумните нива на два провъзпалителни цитокина при LPS-индуциран модел на възпаление и многократно прилагане на изследваните вещества.

При сравняване на резултатите на изследваните средства при еднократно и 14-дневно прилагане, както и при модела на хронична невропатна болка (Таблица 1), се открояват следните закономерности в техните аналгетични и противовъзпалителни ефекти:

Бенфотиамин приложен еднократно показва средна продължителност на аналгетичния ефект при теста гореща плоча, докато при 14-дневно прилагане този ефект е с голяма продължителност. Това налага извода, че бенфотиамин е по-добре да се прилага многократно в случаите на термична болка с цел постигане на по-добър обезболяващ ефект. При теста с механичен натиск бенфотиамин няма ефект при еднократно прилагане, докато при многократно проявява ранен и кратък аналгетичен ефект. Следователно бенфотиамин може да покаже аналгетичен ефект при механично предизвикана болка след многократно прилагане. При формалиновия тест бенфотиамин приложен еднократно повлиява ранната фаза на болкова реакция във високи дози, докато късната фаза на болкова реакция се повлиява от всички приложени от нас дози. Многократното 14-дневно прилагане на бенфотиамин показва по-различен ефект – високата доза повлиява ранната фаза на болкова реакция, докато ниската доза, вероятно поради кумулиране на ефекта проявява такъв върху късната фаза на болкова реакция. Налага се обобщението, че еднократното прилагане на бенфотиамин във високи дози повлиява ранната фаза, а в по-ниски приложен многократно и късната фаза на болковата реакция.

Следователно бенфотиамин е надеждно средство за потискане на болки от химичен характер.

При модела на хронична болка бенфотиамин не показва аналгетичен ефект при теста гореща плоча, докато при аналгезиметър теста регистрирахме ранен и продължителен обезболяващ ефект. Следователно можем да заключим, че бенфотиаминът е по-подходящ за потискане на болки, в резултат от механичен натиск.

Противовъзпалителното действие на бенфотиамин не се доказва в нашите експерименти. Както карагенин-индуцирания оток не се променя независимо от еднократно или 14-дневно третиране с бенфотиамин, така и липополизахарид-индуцираното възпаление не промени нивата на интерлевкин 6. Установеното от нас понижение в нивото на TNF- α само от най-високата доза бенфотиамин не подкрепи тезата за наличие на значим антиинфламаторен ефект.

Алфа-липоевата киселина при еднократно приложение показва средна продължителност на аналгетичния ефект, докато при многократно 14-дневно прилагане този ефект е с голяма продължителност. Следователно алфа-липоевата киселина може да се прилага многократно с цел постигане на по-добър обезболяващ ефект при случаи на термична болка. При теста с механичен стимул алфа-липоевата киселина не показва ефект при еднократно прилагане, докато при многократно прояви ранен и кратък аналгетичен ефект. Това ни дава основание да препоръчаме многократно прилагане на алфа-липоева киселина при болка предизвикана от механичен стимул. При формалиновия тест алфа-липоевата киселина повлия ранната и късната фаза на болковата реакция, както при еднократно, така и при многократно приложение. Това налага извода, че алфа-липоевата киселина е ефикасно средство за повлияване на болки от химичен характер.

При модела на невропатна болка алфа-липоевата киселина показва продължителен аналгетичен ефект и при двата ноцицептивни модела, което налага извода, че тя е подходящ медикамент в комбинираната терапия на хроничната болка.

При карагениновия модел на възпаление алфа-липоевата киселина показва продължителен противовъзпалителен ефект при еднократно и многократно приложение. При LPS-индуцираното възпаление алфа-липоевата киселина понижи серумните нива на TNF- α , а най-ниската доза увеличи нивото на IL-6. Това налага обобщението, че алфа-липоевата

киселина може да бъде ефективно средство в комбинираната терапия на възпалителни процеси.

Габапентинът приложен еднократно и многократно показва голяма продължителност на аналгетичния ефект при теста гореща плоча. При теста с механичен натиск габапентинът приложен еднократно прояви късен аналгетичен ефект, докато при 14-дневно прилагане обезболяващия ефект беше ранен и кратък. При формалинов тест габапентинът приложен еднократно и многократно повлия и ранната, и късната фаза на болковата реакция. Тези данни ни позволяват да заключим, че габапентинът може да бъде ефикасно средство при лечение на различни по характер остри болкови синдроми.

При модела на хронична болка габапентинът показва късен и продължителен аналгетичен ефект само при теста гореща плоча. Тези данни потвърждават обезболяващият ефект на габапентин при невропатна болка, особено предизвикана от топлинен стимул.

При карагенин-индуцирания модел на възпаление габапентин приложен еднократно потисна началната и късната фаза на възпалителния отговор, докато при многократно приложение не показва противовъзпалителен ефект. При LPS-индуцирания модел на възпаление габапентинът не промени нивата на IL-6 и TNF- α . Установените резултати от изследване на противовъзпалителното действие на габапентина ни дава основание да препоръчаме еднократното прилагане на габапентин при използването му като противовъзпалително средство поради по-изразен антиинфламаторен ефект.

Кетамин приложен еднократно показва кратка продължителност на аналгетичния ефект при теста гореща плоча, докато при 14-дневно приложение този ефект е с голяма продължителност. При теста с механичен натиск кетаминът при еднократно прилагане проявява продължителен аналгетичен ефект, докато при многократно приложение този ефект е кратък. Следователно кетаминът проявява по-добър обезболяващ ефект при случаите на термична болка, ако се прилага многократно, а при механично предизвикана болка е по-добре еднократното му приложение. При формалиновия тест кетаминът повлиява само ранната фаза на болковата реакция както при еднократно, така и при многократно приложение. Това ни дава основание да заключим, че кетаминът е надеждно средство за потискане на болки от химичен произход.

При модел на хронична болка кетаминът прояви късен и продължителен обезболяващ ефект при теста гореща плоча и ранен и продължителен – при теста с механичен натиск. Следователно кетаминът е надеждно адювантно средство при лечение на хронична невропатна болка.

При нашите експерименти не се доказва противовъзпалително действие на кетамина при карагениновия модел на възпаление при еднократно и многократно му прилагане. При модела на LPS-индуцирано възпаление кетаминът промени нивата само на TNF- α .

Таблица 1. Сравняване ефектите на изследваните вещества при еднократно и 14-дневно прилагане, както и върху модел на хронична невропатна болка по различни тестове на аналгетично и противовъзпалително действие.

Вещество Тест	Еднократно прилагане				14-дневно прилагане				Хронична невропатна болка			
	Бенфотиамин	Алфа липоева к-на	Габапентин	Кетамин	Бенфотиамин	Алфа липоева к-на	Габапентин	Кетамин	Бенфотиамин	Алфа липоева к-на	Габапентин	Кетамин
Гореща плоча	Средна продължителност на аналгезията	Средна продължителност на аналгезията	Голяма продължителност на аналгезията	Краткотрайна аналгезия	Голяма продължителност на аналгезията	Голяма продължителност на аналгезията	Голяма продължителност на аналгезията	Голяма продължителност на аналгезията	Няма ефект	Късен и продължителен ефект	Късен и продължителен ефект	Късен и продължителен ефект
Аналгезиметър	Без ефект	Без ефект	Късен аналгетичен ефект	Продължителен аналгетичен ефект	Ранен и кратък аналгетичен ефект	Ранен и кратък аналгетичен ефект	Ранен и кратък аналгетичен ефект	Ранен и кратък аналгетичен ефект	Ранен и продължителен ефект	Ранен и продължителен ефект	Без ефект	Ранен и кратък ефект
Формалинов тест	Повлияване на ранната и късната болкови реакции	Повлияване на ранната и късната болкови реакции	Повлияване на ранната и късната болкови реакции	Повлияване на ранната болкова реакция	Високата доза повлия ранната, а ниската доза – късната болкова реакция	Повлияване на ранната и късната болкови реакции	Повлияване на ранната и късната болкови реакции	Повлияване на ранната болкова реакция	-	-	-	-
Плетизмометър	Без ефект	Продължителен противовъзпалителен ефект	Потискане на началната и късната фаза на възпаление	Без ефект	Без ефект	Продължителен противовъзпалителен ефект	Без ефект	Без ефект	-	-	-	-

ИЗВОДИ

1. Бенфотиаминът при еднократно прилагане проявява аналгетична активност при тестовете с топлинен и химичен болков стимул, а при многократно третиране аналгетична активност се установи при трите ноцицептивни теста. При карагениновия модел на възпаление не се установи противовъзпалителен ефект.
2. Алфа-липоевата киселина при еднократно прилагане прояви аналгетичен ефект при тестовете с топлинен и химичен болков стимул, а при многократно прилагане тя показва аналгетична активност при трите ноцицептивни теста. При карагениновия модел на възпаление тя прояви значим противовъзпалителен ефект както при еднократно, така и при многократно приложение.
3. Габапентинът при еднократно и многократно прилагане показва аналгетичен ефект при всички използвани тестове. При карагенин-индуцирания модел на възпаление противовъзпалителен ефект се установи само при еднократното му приложение.
4. Кетаминът показва изразен антиноцицептивен ефект при еднократно прилагане и механично предизвикана болка и при многократно прилагане и термична болка. Не прояви противовъзпалителен ефект при карагенинов модел на възпаление.
5. При модел на невропатна болка габапентинът, алфа-липоевата киселина и кетаминът проявяват аналгетична активност, докато бенфотиаминът не показва аналгетична активност при теста с топлинен болков стимул.
6. При модел на невропатна болка бенфотиаминът, алфа-липоевата киселина и кетаминът проявяват аналгетична активност, докато габапентинът не показва аналгетична активност при теста с механичен болков стимул.
7. При липополизахарид-индуцирания модел на възпаление бенфотиаминът и габапентинът не проявиха значим ефект върху нивата на TNF- α , докато алфа-липоевата киселина и кетаминът понижиха нивата на TNF- α . Не се установи понижение на нивата на IL-6 при всички изследвани вещества, приложени многократно.

ПРИНОСИ

1. С предимно научен характер

1.1. Установена е аналгетичната активност на изследваните вещества при еднократно и многократно прилагане при модели на болка с термичен, механичен и химичен стимул.

1.2. Установена е противовъзпалителната активност на изследваните вещества при еднократно и многократно прилагане при модел на карагенин-индуцирано възпаление. За първи път е установена противовъзпалителна активност на габапентин при модел на остро ексудативно възпаление.

1.3. Установена е аналгетичната активност на изследваните вещества приложени многократно върху модел на хронична невропатна болка.

1.4. Изследвани са промените в нивата на на TNF- α и IL-6 при многократно прилагане на изследваните вещества при модел на LPS-предизвикано възпаление.

2. С предимно приложен характер

2.1. Бенфотиамин е надеждно средство за потискане на остра и хронична невропатна болка, както еднократно, така и многократно приложен, но е лишен от противовъзпалителен ефект.

2.2. Алфа-липоевата киселина е с изразен аналгетичен ефект спрямо остра и хронична невропатна болка (еднократно и многократно приложена) и показва продължителен противовъзпалителен ефект.

2.3. Габапентин е ефикасно средство за лечение на болки от различен характер, приложен еднократно или многократно. Като противовъзпалително средство габапентин проявява ефект при еднократно прилагане и може да се приложи в клиничната практика за овладяване на остри възпалителни болкови прояви.

2.4. Кетамин (еднократно или многократно приложен) може да се използва за потискане на различни остри болкови реакции, на хронична невропатна болка, но не проявява противовъзпалителен ефект.

2.5. Използваните модели и схеми на проучване на фармакологични средства имат приложен характер за обучение на специализанти по фармакология.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

I. Участия в конгреси, конференции и други научни форуми

1. **N. Doncheva**, D. Getova (2010). Study on the effects of ketamine on analgesic tests and on learning and memory in rats. 6th National Congress of Pharmacology, 1-4 October, 2009, Varna. Autonomic & Autacoid Pharmacology, 2010, 30:14-15.

2. L. Popova, **N. Doncheva**, A. Mihaylova. (2012). Antinociceptive effects of alfa-lipoic acid, Benfotiamine and combined vitamine preparation in rats. 23rd IMSS Congress, 10-12 May, Istanbul, Turkey. Abstract in: Congress book, p. 72-73.

3. **N. Doncheva**, D. Getova (2014). Antinociceptive effect of Gabapentin in naïve and with neuropathic pain rats (poster). International Scientific Conference 1st Trakia Medical Days, 22-23 May, Stara Zagora, Bulgaria.

II. Участия в конгреси, конференции и други научни форуми с публикувани разширени резюмета в списания с импакт фактор

1. **N. Doncheva**, Getova D. (2011). The effects of early post-natal treatment with ketamine on learning, memory and nociception in rats. 24th ECNP Congress, 3-7 September, Paris, France. Abstract P.1.f.002 in: European Neuropsychopharmacology; The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology, Volume 21, suppl. 3, Pages 326-327. IF 4,736.

2. **N. Doncheva**, A. Mihaylova, D. Getova. (2012). Study of the effects of alpha-lipoic acid, benfotiamine and combined vitamin preparation on pain and inflammation in rats. 25th ECNP Congress, 13-17 October, Vienna, Austria. Abstract P.1.c.004 in: European Neuropsychopharmacology; The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology, Volume 22, suppl. 2, Page S168. IF 4,595.

3. **N. Doncheva**, D. Staribratova, D. Getova. (2014). Effects of Benfotiamine and its combined preparation on chronic neuropathic pain model in rats. 27th ECNP Congress, 18-21 October, Berlin, Germany. Abstract P.1.g.009 in: European Neuropsychopharmacology; The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology, Volume 24, suppl. 2, Page S206-207. IF 5,395.

4. **N. Doncheva**, L. Vasileva, K. Saracheva, D. Getova (2015). Antinociceptive effects of ketamine and alpha-lipoic acid in rats with neuropathic pain. 28th ECNP Congress, 29 August- 01 September, Amsterdam,

Netherlands. Abstract P.1.g.011 in: European Neuropsychopharmacology; The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology, ISSN 0924-977X, Vol 25, suppl. 2, Page S243-244. IF 5,395.

III. Публикувани научни статии

1. D. Getova, **N. Doncheva** (2011) Study the effects of ketamine on nociception and on learning and memory in rats. *Folia Medica*, 53(1): 5-12.

2. **N. Doncheva**, D.Getova (2014). Antinociceptive effect of Gabapentin in naïve and with neuropathic pain rats. *Trakia Journal of Sciences*, vol. 12, Suppl. 1, 127-131.

3. **Doncheva N**, Vasileva L, Ivanovska M, Petrova A, Murdjeva M, Getova D (2016). Protective effect of multiple administration of alpha – lipoic acid in lipopolysaccharide – induced model of inflammation in rats. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, 5(4): 95-99.

IV. Участия в научни проекти

1. Вътреуниверситетски проект-“Фармакологичен анализ на инхибирането на глутамат-ергичната медиация от невротропни средства.”
Ръководител: проф. д-р Д. Гетова; участници: Д. Димитрова, Н. Присадова, **Н. Дончева**, А. Михайлова, И. Стефанова. № НО-03/2012 на МУ- Пловдив

V. Цитирания

1. D. Getova, **N. Doncheva**. Study the effects of ketamine on nociception and on learning and memory in rats. *Folia Medica*, 2011; 53(1): 5-12.

Цитирана от:

1. Kokhan, V.S., Afanasyeva, M.A., Van'kin, G.I. (2012). α -Synuclein knockout mice have cognitive impairments. *Behavioural Brain Research*, 231 (1): 226-230. IF 3,327

2. Moosavi, M., Yadollahi Khales, G., Rastegar, K., Zarifkar, A. (2012). The effect of sub-anesthetic and anesthetic ketamine on water maze memory acquisition, consolidation and retrieval. *European Journal of Pharmacology*, 677 (1-3): 107-110. IF 2,592

3. Stewart, A.M., Desmond, D., Kyzar, E., et al. (2012). Perspectives of zebrafish models of epilepsy: What, how and where next. *Brain research bulletin*, 87 (2-3): 135-143. IF 2,935

Благодарности към:

Моят научен ръководител проф. д-р Д. Гетова за високия ѝ професионализъм, подкрепата и проявеното търпение, без които този дисертационен труд не би бил възможен. За всичко, на което ме е научила сърдечно ѝ благодаря.

Членовете на научното жури – за отзивчивостта и високия им професионализъм.

Колегите от Катедрата по фармакология и лекарствена токсикология и Катедрата по фармакология и клинична фармакология за проявеното разбиране, подкрепа и помощ при осъществяване на експериментите.

Й. Коликова и В. Желязкова за помощта и прецизната работа при осъществяване на експериментите.

Колегите от Научно-изследователския център по имунология към Катедрата по микробиология и имунология и по-специално на проф. д-р М. Мурджева и д-р М. Ивановска за осъществяването на имунологичните експерименти.

Академичното ръководство на МУ – Пловдив за институционалната подкрепа и специално на ректора на МУ – Пловдив чл.-кор. проф. д-р Стефан Костянев и зам.-ректора по НИД проф. д-р Виктория Сарафян.

Моето семейство за подкрепата и проявеното търпение по време на написването на този дисертационен труд.