



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ”ФАРМАКОЛОГИЯ И КЛИНИЧНА ФАРМАКОЛОГИЯ“

Д-Р ХРИСТИНА ИВАНОВА ЗЛАТАНОВА

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ФАРМАКОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА
АНАЛГЕТИЧНА И ПРОТИВОВЪЗПАЛИТЕЛНА АКТИВНОСТ НА
НОВОСИНТЕЗИРАНИ ПИРОЛОВИ СЪЕДИНЕНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен “доктор”

Докторска програма “Фармакология (вкл. Фармакокинетика и
химиотерапия)”

Научен ръководител:

Проф. д-р Иванка И. Костадинова, дм

Научен консултант:

Д-р Дарина С. Барбутска, дм

Официални рецензенти:

Проф. д-р Димитър Н. Терзииванов, дмн

Доц. д-р Галя Цв. Ставрева-Маринова, дм

Пловдив, 2017

Дисертационният труд се състои от 197 страници. Той е онагледен с 94 фигури и 18 таблици. Приложенията към дисертационния труд са с обем 33 страници и включват 57 таблици. Библиографията включва 269 литературни източника.

Докторантът работи като асистент в Катедра по фармакология и клинична фармакология към Медицински факултет на Медицински университет – Пловдив.

Синтезът на изследваните вещества е осъществен в катедра Органичен синтез и горива към Факултет по химични технологии на Химикотехнологичен и металургичен университет, гр. София. Експерименталните изследвания са проведени в Катедра по фармакология и клинична фармакология, Катедра по клинична лаборатория, Катедра по анатомия, хистология и ембриология, Морфологичен изследователски център и Катедра по микробиология и имунология на Медицински университет – Пловдив.

Част от изследванията са финансирани по вътреуниверситетски проект НО-7/2015 на МУ-Пловдив.

Дисертационният труд е одобрен и насрочен за публична защита от разширен катедрен съвет на Катедра по фармакология и клинична фармакология към МФ на МУ-Пловдив, състоял се на 23.11.2017 год.

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

Чл.-кор. проф. д-р Стефан Костянев, дмн

Проф. д-р Иванка Костадинова, дм

Проф. д-р Димитър Терзииванов, дмн

Доц. д-р Галя Ставрева-Маринова, дм

Доц. д-р Иванка Атанасова, дм

Резервни членове: Доц. д-р Илия Костадинов, дм и Доц. д-р Николай Кантарев, дм

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел и Катедра по фармакология и клинична фармакология към МФ на МУ-Пловдив, както и при поискване на e-mail: h.zlatanova@gmail.com

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	5
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	8
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	13
Остра и субхронична токсичност	13
„Доза-ефект” зависимост на антиноцицептивния ефект на изследваните съединения при тест „гореща плоча“ след еднократно и многократно третиране	26
„Доза-ефект” зависимост на антиноцицептивния ефект на изследваните съединения при плантарен тест след еднократно и многократно третиране	29
„Доза-ефект” зависимост на антиноцицептивния ефект на изследваните съединения при тест „tail flick“ след еднократно и многократно третиране.....	33
„Доза-ефект” зависимост на антиноцицептивния ефект на изследваните съединения при тест на Randall & Selitto след еднократно и многократно третиране	35
„Доза-ефект” зависимост на антиноцицептивния ефект на изследваните съединения при формалинов тест след еднократно и многократно третиране	37
„Доза-ефект” зависимост на противовъзпалителния ефект на изследваните съединения при карагенинов модел на възпаление след еднократно и многократно третиране.....	40
Влияние на изследваните съединения върху нивата на серумните цитокини TNF α , IL-10 и TGF- β 1 при еднократно и многократно третиране.....	44
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	48
ИЗВОДИ	51
ПРИНОСИ	52
СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	53

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА БЪЛГАРСКИ ЕЗИК

АлАТ – аланин аминотрансфераза

АсАТ – аспартат аминотрансфераза

ГАМК – гама аминамаслена киселина

ГКС - глюкокортикостероиди

НЛР – нежелана лекарствена реакция

НСПВС – нестероидни противовъзпалителни средства

СУЕ – скорост на утаяване на еритроцитите

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА АНГЛИЙСКИ ЕЗИК

ASIC – киселинно-чувствителен йонен канал

COX - циклооксигеназа

CRP – С-реактивен протеин

DPP-IV – дипептидил пептидаза

ELISA – ензим-свързан имуносорбентен тест

IFN- γ – интерферон гама

IL-10 – интерлевкин десет

IL-1h – интерлевкин едно-свързан протеин

IL-1 α – интерлевкин едно алфа

IL-1 β – интерлевкин едно бета

IL-2 – интерлевкин две

IL-6 – интерлевкин шест

IL-8 – интерлевкин осем

LPS - липополизахарид

NF- κ B – нуклеарен фактор капа В

NGF – невронален растежен фактор

PGE₂ – простагландин E₂

PGI₂ - простациклин

TGF- β 1 – трансформиращ растежа фактор бета

TLR-4 – тол-подобен рецептор четири

TNF- α – тумор некротизиращ фактор алфа

TxA₂ – тромбоксан A₂

ВЪВЕДЕНИЕ

Диагностицирането и лечението на острата и хронична болка е медицински и социален проблем. В съвременни епидемиологични проучвания на различни автори се посочва, че повече от 1.5 млрд души страдат от хронична болка (American Academy of Pain Medicine). При болка се променя качеството на живот на пациентите и се установява загуба на ежедневни жизнени функции. Недостатъчният контрол на болката може да доведе до нарушена рехабилитация на пациентите и продължителни хоспитализации. Ефикасното лечение на хроничната болка води до подобряване качеството на живот, повишаване на работоспособността и подобряване на отношенията в социалната сфера. Проблемите при лечението на болката са свързани с характера, патогенезата на различните видове болка, необходимостта от продължително лечение при хроничната болка, ограничен брой лекарствени продукти с аналгетично, антипиретично и противовъзпалително действие, фармакогенетични особености на пациента. Индивидуалната вариабилност на възприемането на болката и разликите в ефикасността на аналгетичните лекарства са сложни феномени и са частично генетично предопределени. Решението на проблемите е свързано със създаването на нови лекарствени продукти с аналгетично и противовъзпалително действие и провеждането на персонализирана терапия.

Клиничната използваемост на нестероидните противовъзпалителни средства (НСПВС) е силно ограничена, тъй като 20% до 25% от всички регистрирани нежелани лекарствени реакции (НЛР) се дължат на тяхната употреба. Този сериозен недостатък е свързан с механизма им на действие – простагландините участват в протичането на редица физиологични процеси и инхибицията на техния синтез води до множество странични реакции, някои от които животозастрашаващи и водещи до хоспитализация (напр. кървене от гастроинтестинален тракт). В опит да се минимизират тези странични реакции са създадени селективни циклооксигеназа-2 (COX-2) инхибитори (коксиби); при тях обаче се наблюдава повишена честота на тромботични инциденти. Това налага ограничения в употребата на НСПВС. Лекарствени продукти като кортикостероиди, антидепресанти, антиепилептични средства, опиати, които са включени в комбинираната терапия на болката, имат също сериозни нежелани лекарствени реакции.

Търсенето на нови медикаменти с аналгетична и противовъзпалителна активност, които да са с подобрени лекарствена поносимост и безопасност и висока ефикасност е необходимост. Причини за това са: 1. Малкият брой лекарствени продукти с аналгетично действие; 2. Широката употреба на лекарствени продукти с такова главно фармакологично действие; 3.

Нежелани лекарствени реакции, свързани с увреждане функциите на гастроинтестиналния тракт, бъбреци, сърце, кръвотворна система. Съществуват множество подходи за синтез на молекули с потенциални аналгетична и противовъзпалителна активност и дизайн на експериментални и клинични проучвания. Един от тях е базиране на новата молекула върху архитектурата на избран за прототип съществуващ медикамент.

Пироловият хетероцикъл е включен в химичната структура на множество медикаменти с разнообразни активности (напр. антитуберкуозна, антимикотична, инхибитори на DPP-IV и др.). Някои класически и съвременни НСПВС (кеторолак, толметин, золпирак) съдържат пиролов пръстен. В редица проучвания е доказана неговата роля за потискане на възпалението (Kim et al, 2014) (Indumathi et al, 2015). На фона на разнообразната му биологична активност, той притежава сравнително добра поносимост и безопасност. Усилията на изследователите са насочени към синтез и проучване на нови молекули с аналгетична и противовъзпалителна активност. Новосинтезираните производни, разгледани в дисертационния труд са деривати на N-пиролилкарбоксилната киселина и са ориентирани към структурата на съвременния медикамент целекоксиб (селективен COX-2 инхибитор от групата на коксибите). Задачата на експериментаторите и клиницистите е да изучат и да изберат най-подходящата структура за нови лекарствени продукти с аналгетично и противовъзпалително действие.

ЦЕЛ

Цел на настоящето изследване е да се проучат седем новосинтезирани производни на N-пиролилкарбоксилната киселина за аналгетично и противовъзпалително действие, след еднократно и многократно интраперитонеално приложение на плъхове.

ЗАДАЧИ

1. Да се изследва остра и субхронична токсичност на седем новосинтезирани производни на N-пиролилкарбоксилната киселина.

2. Да се изследва “доза-ефект” зависимостта на антиноцицептивния ефект на новосинтезираните пиролови съединения при животински болкови модели с прилагане на термичен, механичен и химичен стимул в условията на еднократно и 14-дневно приложение.

3. Да се изследва “доза-ефект” зависимостта на противовъзпалителния ефект на новосинтезираните пиролови съединения при модел на възпаление с карагенин в условията на еднократно и 14-дневно приложение.

4. Да се определи влиянието на избрани новосинтезирани пиролови съединения върху серумните нива на провъзпалителния цитокин TNF- α и противовъзпалителните цитокини TGF- β 1 и IL-10 при липополизахарид-индуцирано възпаление в условията на еднократно и 14-дневно приложение.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването се проведе върху 574 мъжки полови зрели бели плъхове порода *Wistar* със средно тегло 150-170 гр. Животните са отглеждани при стандартни лабораторни условия: 12:12 часа тъмно-светъл цикъл, 45% относителна влажност на въздуха, температура 26.5 ± 1 °C и свободен достъп до храна и вода. Експериментите са одобрени от Комисията по етика към животните на Българската агенция по безопасност на храните с разрешително № 128/09.12.2015 г. и решение на Етичната комисия при МУ – Пловдив с протокол № 2/31.03.2016 г.

Изследваните съединения са синтезирани в катедра Органичен синтез и горива, Факултет по химични технологии, ХТМУ гр. София.

I. Изследване на остра токсичност на новосинтезираните пиролови съединения

Използвани са 126 животни, третирани перорално с изследваните седем съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f и 3g еднократно в дози 100 мг/кг т.м., 500 мг/кг т.м. и 1000 мг/кг т.м. Животните са разпределени на случаен принцип в 21 групи, по 6 животни в група. Критерий за остра токсичност е брой умрели животни за 24 часа.

Седемте съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f и 3g са част от по-голяма серия от ново синтезирани субстанции, като останалите 16 съединения също са преминали опити за остра токсичност и на база получените резултати са избрани дози от 10, 20 и 40 мг/кг т.м. За да има последователност в опитите и възможност за адекватно сравняване и групиране на резултатите, както и обсъждане на връзката „структура-активност” за седемте съединения, обект на дисертационния труд, са избрани същите дози.

II. Изследване на субхронична токсичност на новосинтезираните пиролови съединения

1. 1. Изследване на хематологични показатели и стандартен биохимичен профил

Използвани са 176 животни, разделени на случаен принцип в 22 групи по 8 животни. Една група е контролна, третирана с физиологичен разтвор. Останалите групи представляват седемте съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f и 3g, всяко изследвано в три дози – 10, 20 и 40 мг/кг т.м. Животните се третират интраперитонеално за период от 14 дни. След декапитирането на животните се взема кръв за изследване на клинично-лабораторни и хематологични показатели.

Анализът на хематологичните показатели е извършен на автоматичен хематологичен анализатор Advia – 2120i siemens diagnostic. Всички клинично-химични анализи са извършени на анализатор Olympus AV 480,

Beckman Coulter по оригинални програми с фирмени реактиви. Използван е серум, отделен след коагулиране на 37°C за 60 минути и центрофугиране на 3000 об/мин за 10 минути.

Всички клиничко-лабораторни и хематологични изследвания са проведени в Катедра по клинична лаборатория, ФФ, МУ-Пловдив.

1. 2. Изследване на хистологични препарати от органи на опитните животни

Изследвани са хистологични препарати от сърце, бъбрек и стомах. Използвани са същите животни от групите за колекциониране на кръв за изследване на биохимични и хематологични показатели. След 14-дневно третиране със седемте новосинтезирани съединения 1с, 2е, 2f, 3d, 3е, 3f и 3g в доза 40 мг/кг т.м. опитните животните (по 3 животни от група) се декапитират и от всяко животно се взимат сърце, стомах и бъбрек. От органите се изготвят фрагменти, дебели около 5-6 мм, които се фиксират при стайна температура в 10% формалин за 24-48 часа и се подготвят за рутинна хистология (оцветяване с хематоксилин-еозин).

Хистологичното изследване е проведено в Катедра по анатомия, хистология и ембриология, МФ и Морфологичен изследователски център към МУ-Пловдив.

III. Изследване на „доза-ефект” зависимостта на аналгетичното действие на тестваните съединения

Използвани са 184 животни, разпределени на случаен принцип в 23 групи по 8 животни. Две групи са контролни – една, третирана с физиологичен разтвор и една, третирана с референтен аналгетик метамизол натрий 200 мг/кг т.м. Останалите групи представляват седемте съединения 1с, 2е, 2f, 3d, 3е, 3f и 3g, всяко изследвано в три дози – 10, 20 и 40 мг/кг т.м. Всички субстанции се прилагат интраперитонеално. Всички изследвани групи са тествани за антиноцицептивно действие след еднократно и многократно (четирнадесетдневно) третиране на пет болкови модела – гореща плоча, плантарен тест, „tail flick”, тест на Randall & Selitto и формалинов тест.

1. 1. Тест “гореща плоча” (Hot plate test)

Използва се гореща плоча (Ugo Basile, Italy) с повърхност с температура 55±5°C. Отчита се латентното време (в секунди), дефинирано 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 е налице вокализация. Максималното време за престой на животните върху плочата (cut-off time) е 30 секунди, за да се избегне перманентно увреждане. Тестването се провежда за всяко животно на първия, втория и третия час след третирането с изследваните вещества.

Критерий за аналгетично действие е удължаване на реакционното време, сравнено с животните, третирани с физиологичен разтвор.

1. 2. Плантарен тест (Hargreaves' method)

Опитното животно се поставя в самостоятелно плексигласово отделение и се оставя свободно подвижно. След период на аклиматизация инфрачервен топлинен източник (Ugo Basile, Italy) се позиционира директно под една от задните лапи на плъха. Автоматично се отчита времето за отдръпване на лапата в секунди. Избраната интензивност на инфрачервеното лъчение е 50 mW/cm^2 и максималното време на нагриване е 30 секунди, за да се избегне прекомерно увреждане на лапата. Специален филтър блокира видимата част от светлинния спектър, за да не подаде нежелан сигнал на животното. Тестването се провежда за всяко животно на първия, втория и третия час след третирането с изследваните вещества. Критерий за аналгетично действие е удължаване на реакционното време, сравнено с животните от контролната група.

1. 3. Тест с отдръпване на опашката (Tail flick test)

Инфрачервен топлинен източник (Ugo Basile, Italy) се поставя и фокусира под опашката на изследваното животно на приблизително 3 см разстояние от дисталния ѝ край. Автоматично се отчита времето за отдръпване на опашката в секунди. Интензивността на лъчението е 80 mW/cm^2 , а максималното време на нагриване е 15 секунди, за да се избегне тъканна увреда. Тестването се провежда за всяко животно на първия, втория и третия час след третирането с изследваните вещества. Критерий за аналгетично действие е удължаване на реакционното време, сравнено с животните, третирани с физиологичен разтвор.

1. 4. Тест с механичен натиск на лапата (тест на Randall & Selitto)

Използва се апарат – аналгезиметър (Ugo Basile, Italy). Чрез малък пластмасов конус със заоблен връх се прилага механичен натиск върху една от задните лапи на плъха и се отчита силата на натиска (г/см^2), при която животното отдръпва тестираната лапа. Тестването се провежда за всяко животно на първия, втория и третия час след третирането с изследваните вещества. Критерий за аналгетично действие е удължаване на реакционното време, сравнено с животните от контролната група.

1. 5. Формалинов тест

0.2% 200 μl формалин се инжектира интрадермално в една от задните лапи на животните един час след въвеждане на изследваните вещества. Измерва се времето за близане на инжектираната лапа в секунди през първите десет минути и на 20-30 минута. Критерий за аналгетично действие е намаляване на времето за близане на лапата, в сравнение с контролната група.

IV. Изследване на „доза-ефект” зависимостта на противовъзпалителното действие на тестваните съединения

Използвани са 184 животни, разпределени на случаен принцип в 23 групи по 8 животни. Две групи са контролни – една, третирана с физиологичен разтвор и една, третирана с референтно противовъзпалително средство диклофенак натрий 25 мг/кг т.м. Останалите групи представляват седемте съединения 1с, 2е, 2f, 3d, 3е, 3f и 3g, всяко изследвано в три дози – 10, 20 и 40 мг/кг т.м. Всички субстанции се прилагат интраперитонеално. Всички изследвани групи са тествани за противовъзпалително действие след еднократно и многократно (четирнадесетдневно) третиране върху експериментален карагенинов модел на възпаление.

1. 1. Оток на задната лапка на плъх, предизвикан с въвеждане на карагенин

Използва се апарат плетизмометър (Ugo Basile, Italy). Преди третирането се измерва обемът 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 на животните от чистата контрола се инжектира интраперитонеално 0.1 мл 0.9% разтвор натриев хлорид; на животните от позитивната контролна група диклофенак в доза 25 мг/кг т. м., а на животните от опитните групи се инжектират интраперитонеално изследваните вещества. С апарат плетизмометър (Ugo Basile, Italy) се отчита обемът изместена течност от задната дясна лапа на плъха на втория, третия, четвъртия и 24 час след третирането с карагенин. Процентът оток на лапата се изчислява по следната формула:

$$\text{Оток на лапата (\%)} = \frac{V_t - V_o}{V_o} * 100$$

V_o – среден обем на лапата преди третиране, V_t – среден обем на лапата на съответен час

Критерий за противовъзпалителна активност е намален оток на лапата спрямо контролната група.

V. Изследване на влиянието на съединения 1с, 2f, 3f и 3g върху серумните нива на провъзпалителния цитокин TNF- α и противовъзпалителните TGF- β 1 и IL-10

Използвани са 80 животни, разпределени на случаен принцип в две серии от 5 групи по 8 животни. Една група е контролна, третирана с физиологичен разтвор. Останалите групи животни са третирани с съединения 1с, 2f, 3f и 3g в доза 40 мг/кг т.м. Всички субстанции се прилагат интраперитонеално. Експерименталните групи от първа серия са

третираны еднократно с изследваните субстанции, след което животните са декапитирани и е взета кръв за изследване. Експерименталните групи от втора серия са третирани многократно (14 дни) с изследваните субстанции, след което животните са декапитирани и е взета кръв за изследване. Четири часа преди колекцията на кръв на всички опитни групи се инжектира интраперитонеално липополизахарид за предизвикване на системно възпаление. За изследване на нивата на TNF- α , TGF- β 1 и IL-10 е използван серум, отделен от събраната кръв след коагулиране на 37°C за 60 минути и центрофугиране на 3000 об/мин за 10 минути.

1. 1. Липополизахарид – индуцирано системно възпаление

Използва се липополизахарид (LPS) на E.coli щам O55. Четири часа преди вземането на кръв за изследване се инжектира интраперитонеално в доза 250 μ g/kg на плъховете от контролната група и третирани еднократно или многократно (14 дни) с избраните съединения.

1. 2. *In vitro* изследване на про- и антиинфламаторни цитокини

Проинфламаторният цитокин TNF- α и противовъзпалителните цитокини TGF- β 1 и IL-10 в серума на плъховете с LPS-индуцирано възпаление, третирани със съединения 1c, 2f, 3f и 3g, са изследвани чрез ELISA с готови търговски китове (Platinum ELISA, eBioscience) при стриктно спазване методичните указания на производителя.

In vitro изследванията на серумни нива на цитокини са извършени в Катедра по микробиология и имунология, ФФ, МУ-Пловдив.

VI. Статистически анализ

Статистическата обработка на данните се осъществи със софтуерен продукт IBM SPSS 20.0. За определяне на разпределението се проведе тест на Kolmogorov-Smirnov. За всеки показател са определени средна аритметична стойност (mean) и стандартна грешка на средната аритметична (\pm SEM). Сравняване на резултатите между групите се извърши с Independent Sample T test. За статистически значими се приемат резултати при уронен на значимост $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

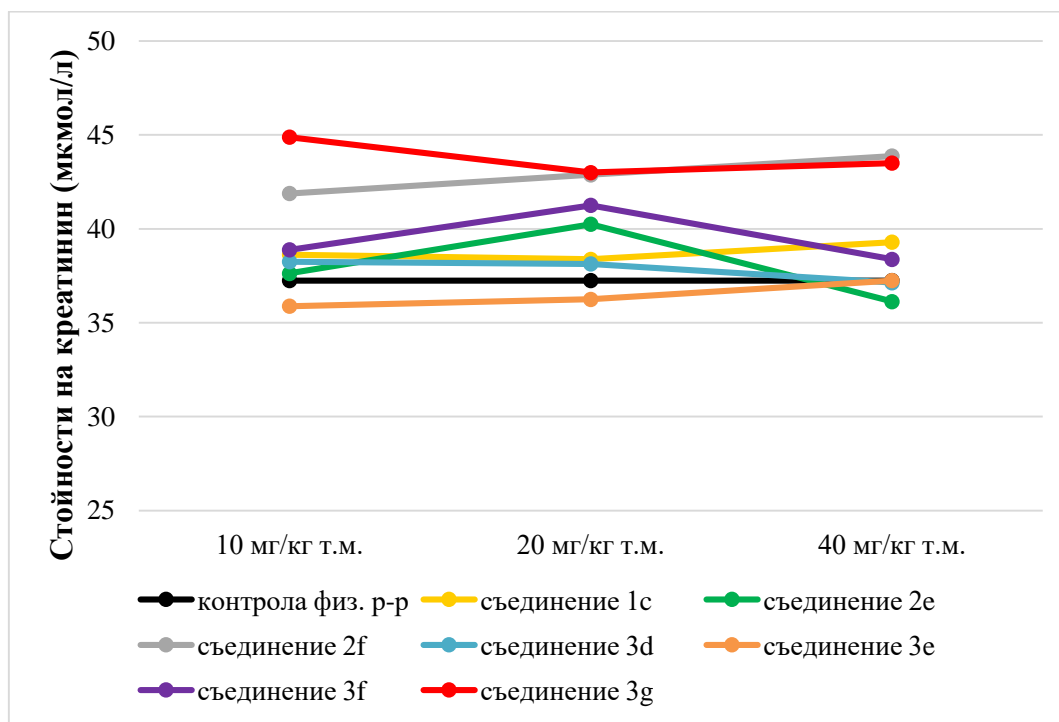
I. ОСТРА И СУБХРОНИЧНА ТОКСИЧНОСТ

След перорално приложение на изследваните седем съединения 1с, 2е, 2f, 3d, 3е, 3f, и 3g, всяко от тях в дози 100, 500 и 1000 мг/кг т.м. всички животни от всички опитни групи преживяха 24 часа, като за наблюдавания период не показаха поведенчески промени.

В достъпната литература съществуват противоречиви данни по отношение на влиянието на НСПВС върху нивата на чернодробните ензими АсАТ и АлАТ. Затова като скрининг за потенциална хепатотоксичност избрахме оценяване на нивата на чернодробни трансминази като маркери за първоначално увреждане на черния дроб. При експериментални условия при плъхове целекоксиб в доза 1 гр/кг т.м. предизвиква изразена чернодробна стеатоза, конгестия и некроза, както и увеличени нива на АсАТ и АлАТ 24 часа след интраперитонеално приложение; такива промени не са наблюдавани след интраперитонеално приложение на дози от 200 и 500 мг/кг т.м. (Drmic et al, 2017). Parada et al. не установяват промени в нивата на АсАТ и АлАТ на плъхове, третирани с целекоксиб спрямо контролни животни, третирани с физиологичен разтвор (Parada et al, 2009). Тези резултати се потвърждават от Sozer et al., които също не регистрират промени в серумната АлАТ на плъхове, третирани с целекоксиб (Sozer et al, 2001). След 14-дневно приложение всички дози на съединения 1с и 2f и най-високите дози на съединения 3е и 3f намаляват достоверно нивата на АлАТ, а съединения 2е, 3d и 3g понижават стойностите на АсАТ и АлАТ. Изследването на чернодробни ензими и в нашето проучване не показва в изследваните дози и време на проучването достоверно увеличение на стойностите на АсАТ и АлАТ.

По време на лечение с някои НСПВС се регистрира нефротоксичност. Бъбречното увреждане може да бъде под формата на интерстициална нефропатия и/или тубулоинтерстициален нефрит. Увреждането на бъбреците обикновено е обратимо и пациентите се възстановяват след прекратяване на употребата на НСПВС (Pathan et al, 2003). Нефротоксичност се среща рядко при използване на целекоксиб, въпреки че са наблюдавани повишени нива на урея и креатинин (Drug Monograph Celecoxib). Koçkaya et al. установяват повишени нива на урея и уреен азот у плъхове, третирани с целекоксиб (Koçkaya et al, 2010). Противоположни са резултатите на Parada et al., които не регистрират промени в нивата на урея, креатинин и пикочна киселина при плъхове, третирани с целекоксиб (Parada et al, 2009). При животните, третирани със съединения 2f, 3f и 3g се наблюдават увеличени нива на креатинин в серума. Съединения 2е и 3f във високите дози, съединения 3d и 3е в най-ниската тествана доза и съединения 2f и 3g във всички дози достоверно понижават нивата на серумна урея, докато съединение 1с в най-ниската доза и съединение 3f в

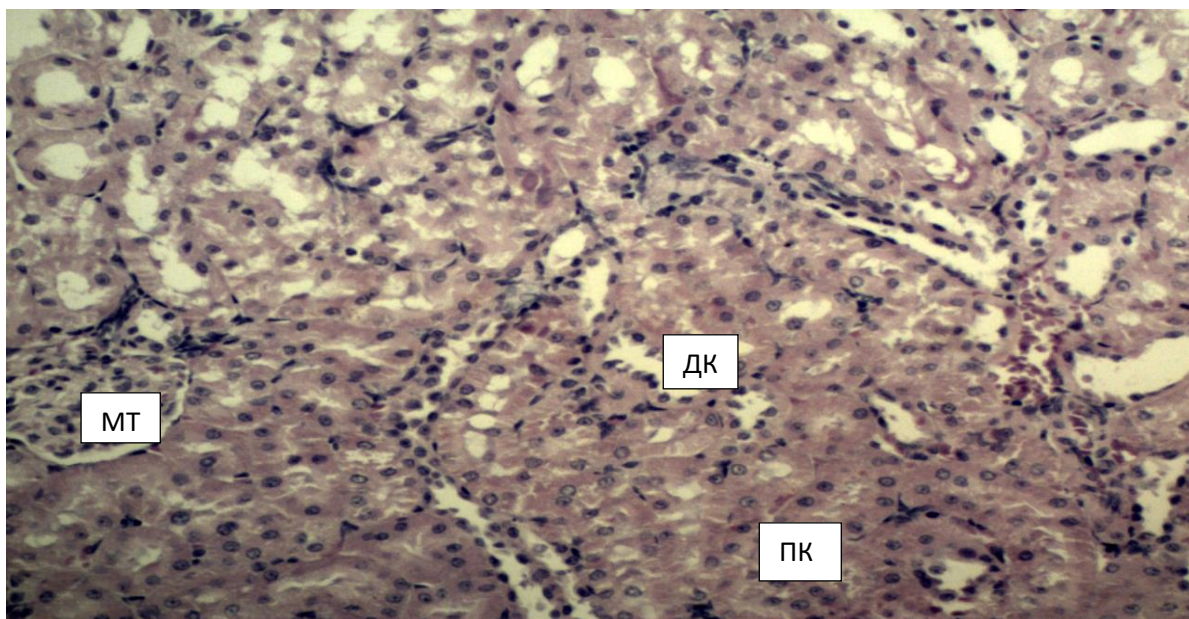
средната доза повишават уреята. Креатининът и уреята са свободно филтрирани от гломерула. Повишаването на нивата на креатинина може да покаже гломерулно увреждане, защото реабсорбцията на креатинин е минимална за разлика от уреята, която се абсорбира в тубулите. На **Фиг. 1** са показани серумните нива на креатинин след третиране със съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f, 3g.



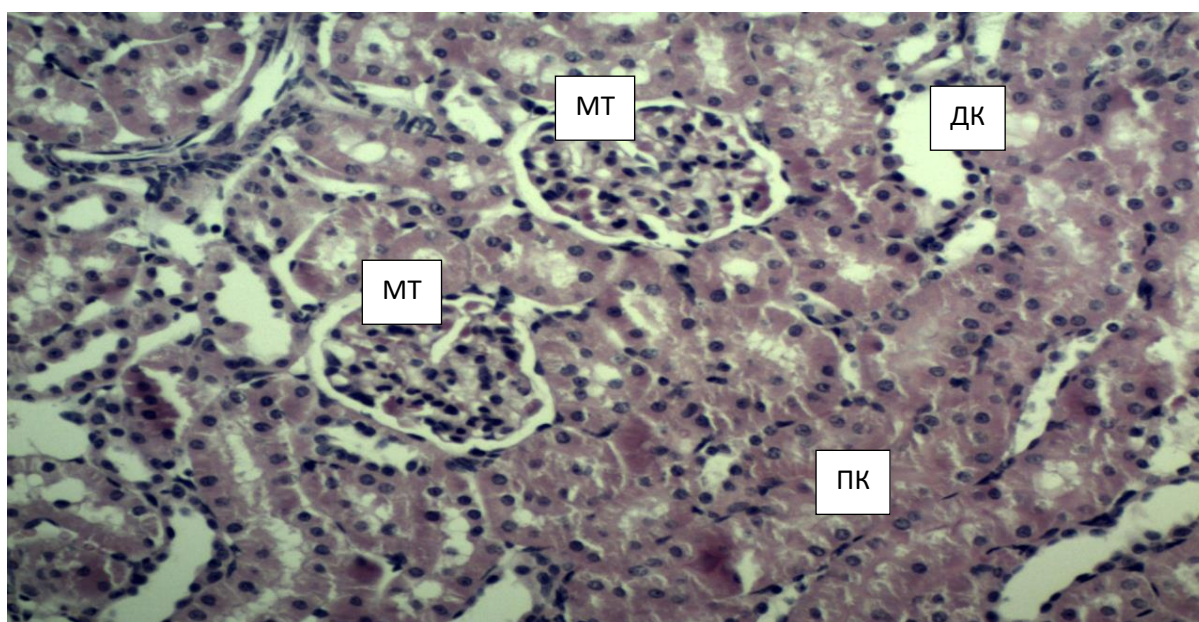
Фиг. 1. Влияние на изследваните съединения в дози 10, 20 и 40 мг/кг т.м. върху серумните нива на креатинин.

За изясняване на влиянието на съединенията върху бъбреците проведехме хистологични изследвания върху тези органи. Коçкауа et al. наблюдават тубулно увреждане и инфилтрация от мононуклеарни клетки в бъбреците на плъхове, третирани перорално с целекоксиб в дози 10 и 50 мг/кг т.м. за 28 дни (Коçкауа et al, 2010). Подобни резултати установяват Sozer et al. Те наблюдават хиалинни отливки в медулата и конгестия в реналната медула и гломерулите на плъхове, третирани с целекоксиб (Sozer et al, 2001). Cooper et al. откриват тубулна некроза у плъхове, третирани с целекоксиб, както и сигнификантна тубулна дилатация, без промени в гломерулите (Cooper et al, 2014). При хистологични срезове от бъбреци на плъхове от контролната група, оцветени с хематоксилин-еозин, се наблюдават добре запазени участъци на паренхима, както в корвата, така и в медуларната зона. (**Фиг. 2.**) Непосредствено под фиброзната капсула откриваме извитите части на проксимални и дистални каналчета, без малпигиеви телца. Във вътрешната зона на кората (коров лабиринт) са представени гломерулите, заобиколени от проксимални и дистални каналчета. Капилярното клъбце на гломерула

е със запазена структура на съдовата стена, без данни за капилярна склероза. Мезангиалната тъкан между капилярните бримки се визуализира чрез дребните и с неправилна форма ядра на мезангиалните клетки. Около гломерула е ясно видима капсулата на Бауман, а пространството на Бауман-Шумлянски е с непроменен размер. Около малпигиевите телца се откриват проксимални извити каналчета с тесен просвет. Те са тапицирани с висок кубичен епител със сферични, нормохромни ядра и добре видимо ядърце. По апикалната повърхност на клетките ясно личат множеството микровили, които светлинномикроскопски се виждат като четковидна ивица. За разлика от проксималните каналчета, извитите части на дисталните каналчета са със значително по-широк просвет. Епителните им клетки са кубични, подчертано по-ниски от тези на проксималните каналчета и без микровили по апикалната им повърхност. Не се установяват участъци с тубулна некроза. Коровата интерстициална субстанция е със запазена структура, без данни за лимфоцитна инфилтрация. В бъбречната сърцевина различаваме външна и вътрешна зона, без рязка граница между тях. Във външната зона се съдържат крайните прави части на проксималните каналчета, широките части на бримките на Хенле и събирателните каналчета. В папиларната част на пирамидите (вътрешна зона) наблюдаваме тънките сегменти на бримките на Хенле и събирателни каналчета. Последните са тапицирани с цилиндрични клетки. Те са със светла цитоплазма, ясни граници помежду си и централно разположено ядро. Не се наблюдават участъци с тубулна некроза. При тъканните проби взети от бъбрек на животните, третирани със съединения 1с и 3е не се наблюдават промени. При сравняване на резултатите от биохимичните и хистологични изследвания можем да обобщим, че съединения 1с и 3е не са нефротоксични. При животните, третирани със съединения 2е, 2f и 3d се наблюдават фокално дилатирани съдове на гломерулите и променена морфология на мезангиалните клетки. При съединения 2е и 3d промени в нивата на креатинина не са наблюдават, а само най-високата доза на съединение 2е намалява нивата на урея, т.е. се касае за случайни находки, а не за признаци на нефротоксичност. При съединение 2f нивата на креатинин са повишени и при него е възможно да говорим за засягане на бъбреците. При животните, третирани със съединения 3f и 3g бъбречната хистология показва изолирани участъци с дилатирани дистални каналчета - епителът е нисък с хиперхромни ядра и с нарушени контакти между клетките, и изобилни дилатирани капиляри извънгломерулно. (Фиг. 3.) И при двете съединения се касае за нефротоксичен потенциал, тъй като при животните, третирани със съединения 3f и 3g се наблюдават увеличени нива на креатинин.



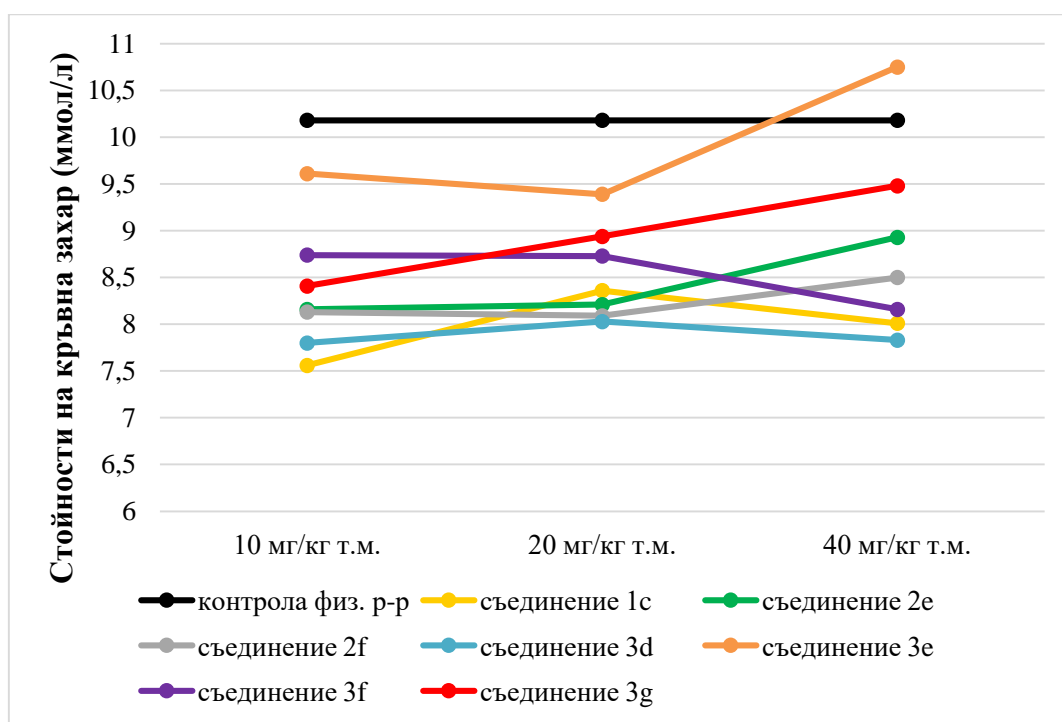
Фиг. 2. Бъбрек на плъх от контролна група. Коров лабиринт. Рутинна хистология, оцветяване с Н-Е; x200. Малпигиево телце (МТ), заобиколено от проксимални (ПК) и дистални извити каналчета (ДК).



Фиг. 3. Бъбрек на плъх от групата, третирана със съединение 3g 40 мг/кг т.м. Коров лабиринт. Рутинна хистология, оцветяване с Н-Е; x200. Малпигиево телце (МТ), заобиколено от проксимални (ПК) и дистални извити каналчета (ДК).

В експериментални проучвания Sanyal et al. установяват, че някои нестероидни противовъзпалителни лекарства (аспирин, нимезулид, фенилбутазон) водят до понижени нива на глюкоза в кръвта поради инхибиране на глюкозния транспорт и някои ензимни промени в тънкото черво (Sanyal et al, 2005). *In vitro* проучвания са показали, обаче, че целекоксиб не засяга значимо чревния пермеабилитет (Tibble et al, 2000). Възниква въпросът дали добавянето на НСПВС към установена терапевтична схема с перорални хипогликемични средства при диабетици

може да доведе до неочаквана хипогликемия поради адитивни ефекти. В клинично проучване, проведено от Mork et al. е установено, че ефектът на НСПВС в конвенционални дози върху нивата на глюкозата е минимален или незначителен, и че НСПВС могат да се употребяват безопасно при пациенти с диабет (Mork et al, 1983). С оглед на противоположните данни от експериментални и клинични проучвания възниква необходимост да се проучи влиянието на новосинтезираните вещества върху глюкозната хомеостаза. При животните, третирани със съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e (в средна доза), 3f (високите дози) и 3g се наблюдава сигнификантно намаление в нивата на кръвна захар, което е сходно с наблюдаваните от Sanyal et al. резултати. На **Фиг. 4.** са показани промени в серумните нива на кръвната захар след третирани със изследваните пиролови съединения.

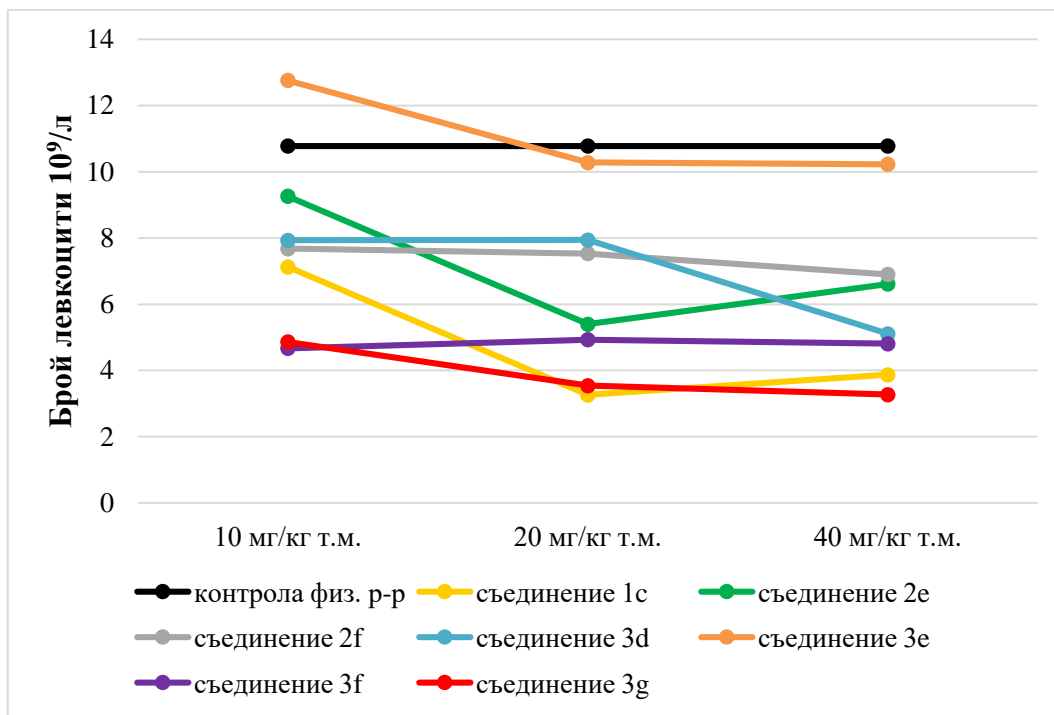


Фиг. 4. Влияние на изследваните съединения в дози 10, 20 и 40 мг/кг т.м. върху серумните нива на кръвна захар.

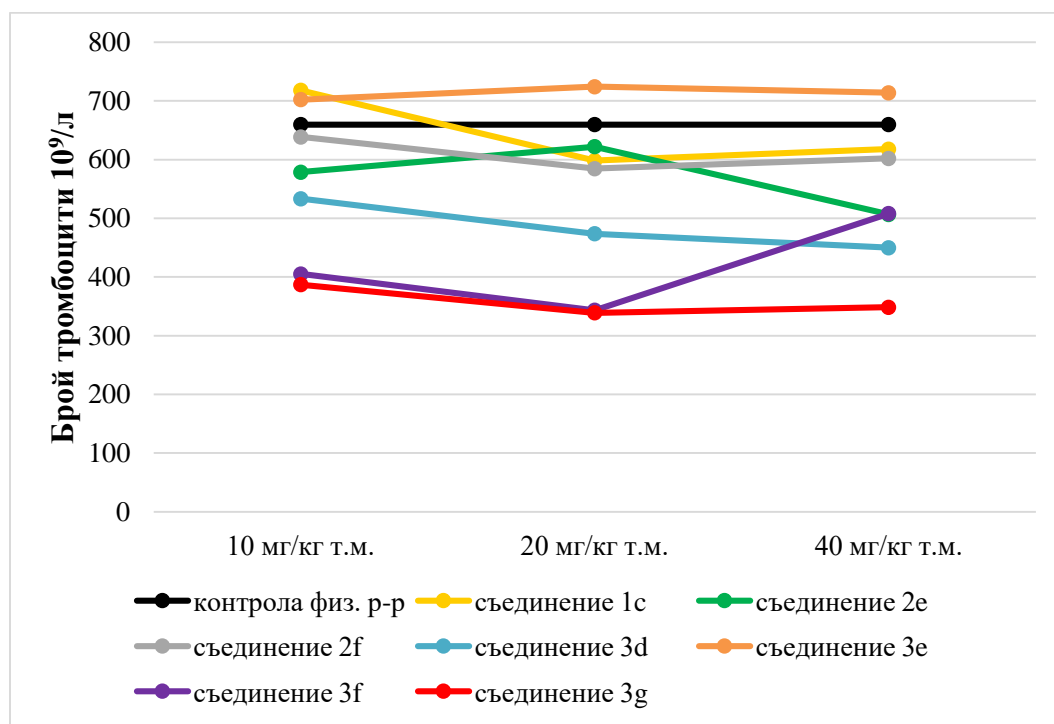
Характерно за употребата на НСПВС е промяна в нивата на тромбоцитите, затова освен проведените биохимични изследвания, ние проследихме и хематологичните параметри на животните, третирани с изследваните съединения. Xu et al. в експериментално изследване върху кахектични мишки установяват сигнификантно увеличение в нивата на еритроцити и хемоглобин у животните, третирани с целекоксиб, сравнено с контролата (Xu et al, 2014). Най-високите дози на съединения 2f и 3d достоверно намаляват хемоглобиновите нива, като понижават и броя еритроцити, макар и без да достигат статистическа достоверност. Възможно е да се говори за потискане на костния мозък в по-високи дози, въпреки че потискането на костния мозък не е характерна нежелана

лекарствена реакция на НСПВС. При опити върху хиперхолестеролемични плъхове Dabhi et al. установяват, че аспирин, ибупрофен и целекоксиб водят до сигнификантно намаление в нивата на левкоцити, а ибупрофен намалява моноцити, С-реактивен протеин и СУЕ (Dabhi et al, 2008). В експериментално проучване на Behal et al. ниски дози еторикоксиб също показват намаление в общия брой левкоцити, както и в нивата на неутрофили, лимфоцити, моноцити и еозинофили, докато високи дози еторикоксиб водят до увеличение на тези стойности (Behal et al, 2009). De Menezes et al. наблюдават намаление в левкоцитния брой у плъхове, третирани с индометацин и селективни СОХ-2 инхибитори, но тази промяна се регистрира след интраперитонеално приложение на LPS, който води до дозо- и времезависимо увеличение в нивата на полиморфонуклеарните неутрофили (De Menezes et al, 2005). При животните, третирани със съединения 1c, 2e (в по-високите дози), 2f, 3d, 3f и 3g се наблюдава сигнификантно намаление в нивата на левкоцитите. Потискането на костния мозък и по-конкретно агранулоцитозата не са типични нежелани лекарствени реакции за НСПВС. Метамизолът е един от малкото СОХ-инхибитори, при употребата на който може да се регистрира НЛР агранулоцитоза. (Basak et al, 2010). Намаляването на белите кръвни клетки може да се дължи на потискане на костния мозък. Друго възможно обяснение е останало противовъзпалително действие, тъй като кръвните проби са взети приблизително 24 часа след инжектирането на карагенина. Тромбоцитите са много чувствителни към инхибиторите на циклооксигеназата, тъй като те не могат да ре-синтезират ензима (Birmingham et al, 2014). Обикновено тромбоцитопенията е транзиторна и преминава след спиране на употребата. За селективните СОХ-2 инхибитори обаче протромботичното състояние е типично, защото те блокират производството на простаглицин (PGI_2), но не и на тромбоксан A_2 (синтезата на TxA_2 зависи от запазената СОХ-1 активност) (Singh, 2014). При животните, третирани със съединения 3f и 3g се наблюдава сигнификантно намаление в нивата на тромбоцитите. Тези резултати обосновават твърдението, че съединенията не са селективни СОХ-2 инхибитори, тъй като тромбоцитите съдържат единствено СОХ-1 изоформата. Останалите съединения 1c, 2e, 2f, 3e и 3d не показват промяна в нивата на тромбоцитите, което ни насочва към търсената СОХ-2 селективност. На **Фиг. 5** и **6** са показани промените в стойностите на хематологични показатели след третиране с изследваните съединения.

При животните, третирани със съединение 3e не се наблюдават промени в стойностите на основните хематологични показатели при сравнение със стойностите на животните от контролната група. При това съединение не регистрираме НЛР, свързани с промени в хематологични показатели след 14-дневно третиране.



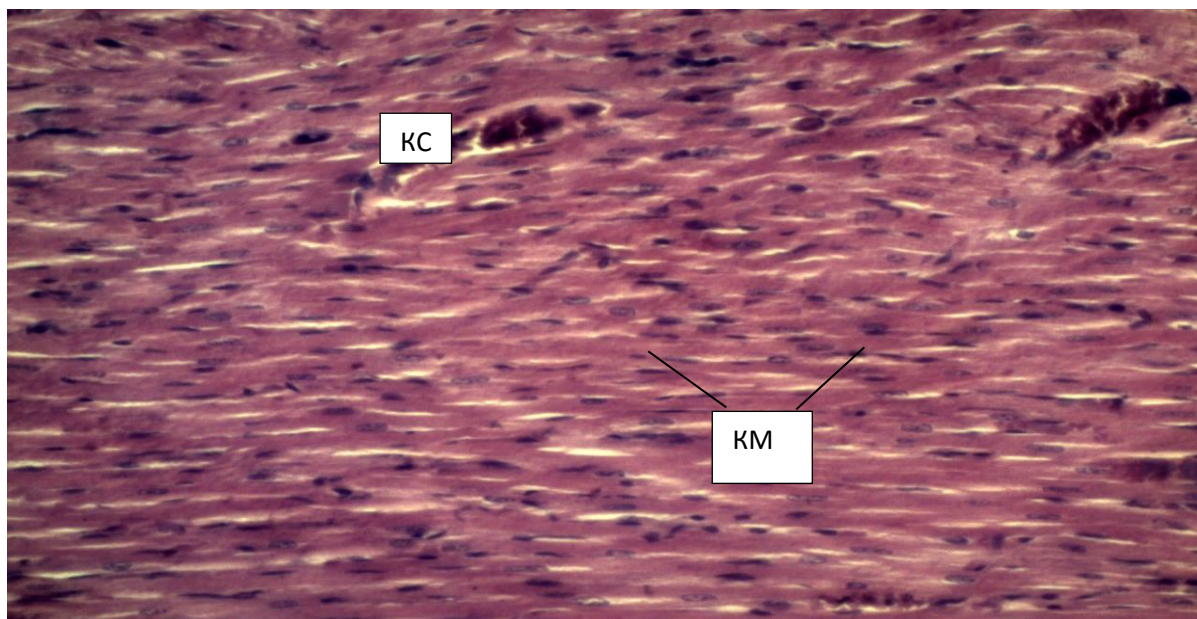
Фиг. 5. Влияние на изследваните съединения в дози 10, 20 и 40 мг/кг т.м. върху броя на левкоцитите.



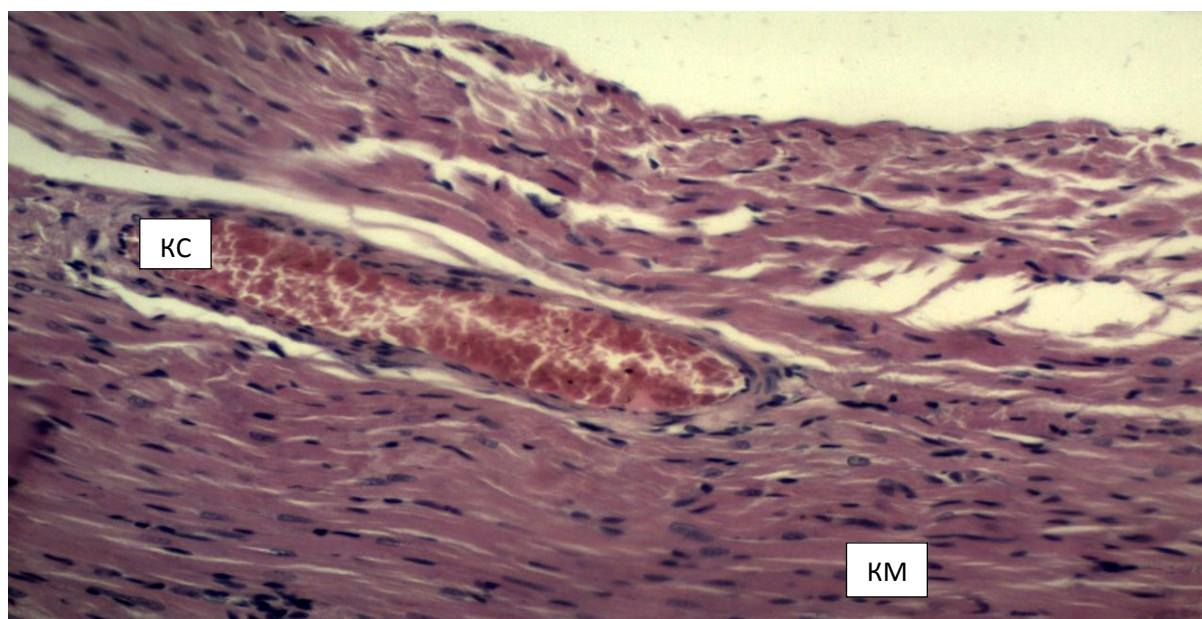
Фиг. 6. Влияние на изследваните съединения в дози 10, 20 и 40 мг/кг т.м. върху броя на тромбоцитите.

Типична нежелана лекарствена реакция, свързана с употребата на селективни COX-2 инхибитори е кардиотоксичност. Тъй като ново синтезираните съединения, обект на настоящото изследване, са базирани върху структурата на целекоксиб, ние очакваме от тях да проявят селективност към втората COX изоформа. Затова проведехме

хистологични изследвания върху сърца, взети от опитните животни. Cooper et al. не установяват сигнификантни хистопатологични промени в миокарда на плъхове, третирани с целекоксиб. Единствено при три от опитните животни е наблюдаван перикардит като при тези животни също не са наблюдавани отклонения в миокардната тъкан (Cooper et al, 2014). Modi et al. установяват, че диклофенак води до натрупване на уратни кристали в миокарда у плъхове (Modi et al, 2012). При хистологични срезове от сърца на плъхове от контролната група, оцветени с хематоксилин-еозин, се наблюдават добре запазени участъци на миокарда, представен от послойно разположени мускулни снопчета от сърдечни мускулни клетки, кардиомиоцити. Слоеве са различно ориентирани и се откриват едновременно надлъжно, косо и напречно срязани мускулни влакна. Кардиомиоцитите са удължени и се разклоняват в двата си края. Цитоплазмата е еозинофилна с добре изразена напречна изчертаност. Ядрото е единично с елиптична (овална) форма. Разположено е в средата на клетките и е добре видимо както при надлъжен, така и при напречен срез. Кардиомиофибрилите са много нежни и рядко на напречни срезове се виждат като малки еозинофилни телца, придаващи на цитоплазмата зърнест вид. Между сърдечните мускулни клетки се откриват и малки удължени ядра, принадлежащи на фиброцитите и фибробластите от съединителната тъкан, разположена между мускулните влакна. Наблюдава се и голямо количество кръвоносни и лимфни съдове. Кръвоносните съдове са със запазена структура на стената и добре кръвонапълнени. **(Фиг. 7.)** При групите, третирани със седемте съединения 1с, 2е, 2f, 3d, 3е, 3f и 3g в доза 40 мг/кг т.м. няма промяна при хистологичното изследване на сърца на плъхове от опитните групи в сравнение с тези на контролната група. При животните, третирани със седемте съединения на фона на добре запазената структура на миокарда се откриват леко дилатирани кръвоносни съдове от малък калибър (капиляри), изпълнени с еритроцити. **(Фиг. 8.)**



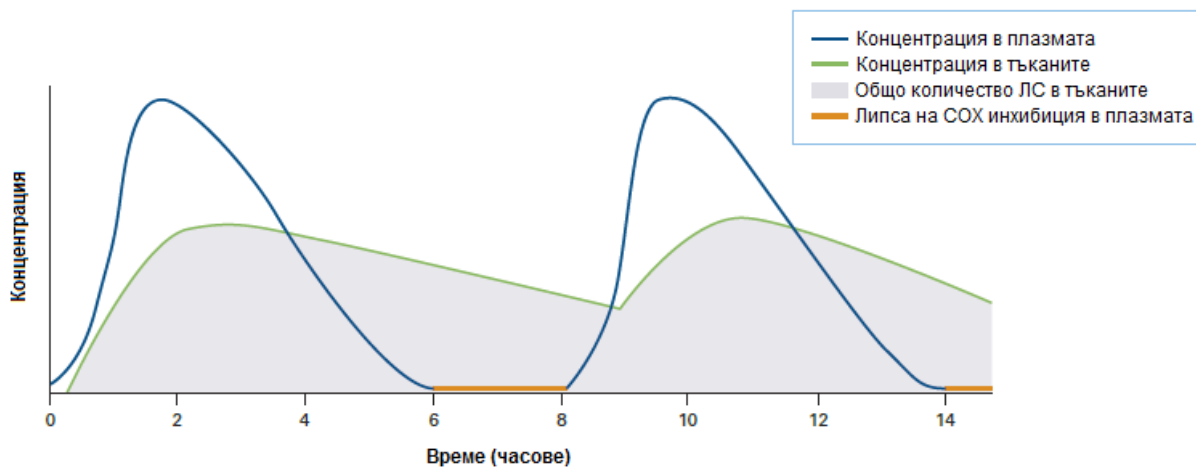
Фиг. 7. Сърце на плъх от контролна група - миокард. Рутинна хистология, оцветяване с Н-Е; x200. Надлъжно, косо и напречно прерязани сърдечни мускулни влакна (KM - кардиомиоцити). Между тях кръвоносни съдове (КС) и малки ядра на съединителнотъканни клетки.



Фиг. 8. Сърце на плъх от групата, третирана със съединение 2e 40 мг/кг т.м. - миокард. Рутинна хистология, оцветяване с Н-Е; x200. Надлъжно, косо и напречно прерязани сърдечни мускулни влакна (KM - кардиомиоцити). Дилатиран кръвоносен съд (КС), изпълнен с еритроцити.

Вазоконстрикцията е характерен ефект за повечето от НСПВС. Тя се дължи на увеличено отделяне на норепинефрин от една страна, и на потискане на ендотелния синтез на съдоразширяващите PGE₂ и PGI₂ от друга. Ниски дози НСПВС с кратък полуживот и интервали на дозиране над 8 ч. могат да позволят възстановяването на вазопротективни COX-2 зависими простагландини – периодите между дозите могат да позволят

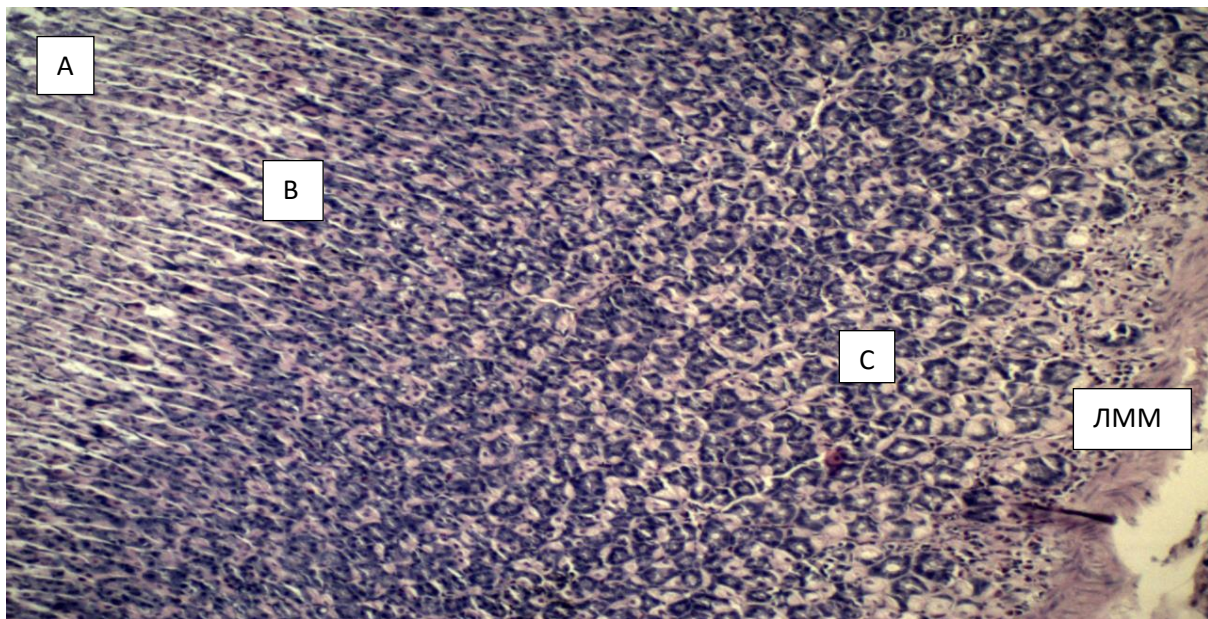
възстановяване на COX ензима и неговите функции в централния компартимент (т.е. кръв, стени на кръвоносни съдове, бъбреци). (Фиг. 9.) Повишената COX-2 активност може да доведе до вазодилатация и потискане на тромбоцитната агрегация. Тези потенциални вазопротективни ефекти на НСПВС с кратък полуживот могат да означават и по-нисък риск от нарушение в бъбречната функция (Hunter et al, 2015).



Фиг. 9. Типични профили на концентрация в плазмата и тъканите на киселинни НСПВС с кратко време на елиминационен полуживот (Hunter TS, Robison C, Gerbino PP. *Am J Manag Care* 2015;21:S139-47).

Освен кардиотоксичност, характерно за НСПВС е засягането на гастроинтестиналния тракт, изразяващо се предимно с ерозии и улцерации. При хистологично изследване на препарати от стомах на плъхове, третирани с индометацин и мелоксикам, извършено от El-Awdan et al. се установяват промени в морфологията на стомашната лигавица. При плъховете, третирани с индометацин, тя е силно засегната, показваща голяма площ от улцерации, заемащи около две трети от дебелината на лигавицата. Стомашната лигавица на плъховете, получили мелоксикам 1 мг/кг т.м. показва нарушена нормална архитектура на жлезите и наличие на много разширени кръвоносни съдове между мускулните влакна на мускуларис мукозе, която е удебелена. Лимфоцитна инфилтрация се наблюдава в мускулната пластинка на лигавицата и в основите на жлезите. Стомашната лигавица на плъховете, получили мелоксикам 2 мг/кг т.м. показва някои деформации на ямките на жлезите с необичайно разширени кръвоносни съдове между тях и в основите на ямките (El-Awdan et al, 2013). Modi et al. също наблюдават добре дефинирани повърхностни улцерации у плъхове, третирани с индометацин. Множество язви, както и некроза на повърхностните слоеве на стомашната лигавица са установени у кучета, третирани с нимезулид (Modi et al, 2012). Подобни резултати установяват Demircan et al., които наблюдават хиперемия и улцерации по стомашната лигавица на плъхове, третирани с индометацин и мелоксикам.

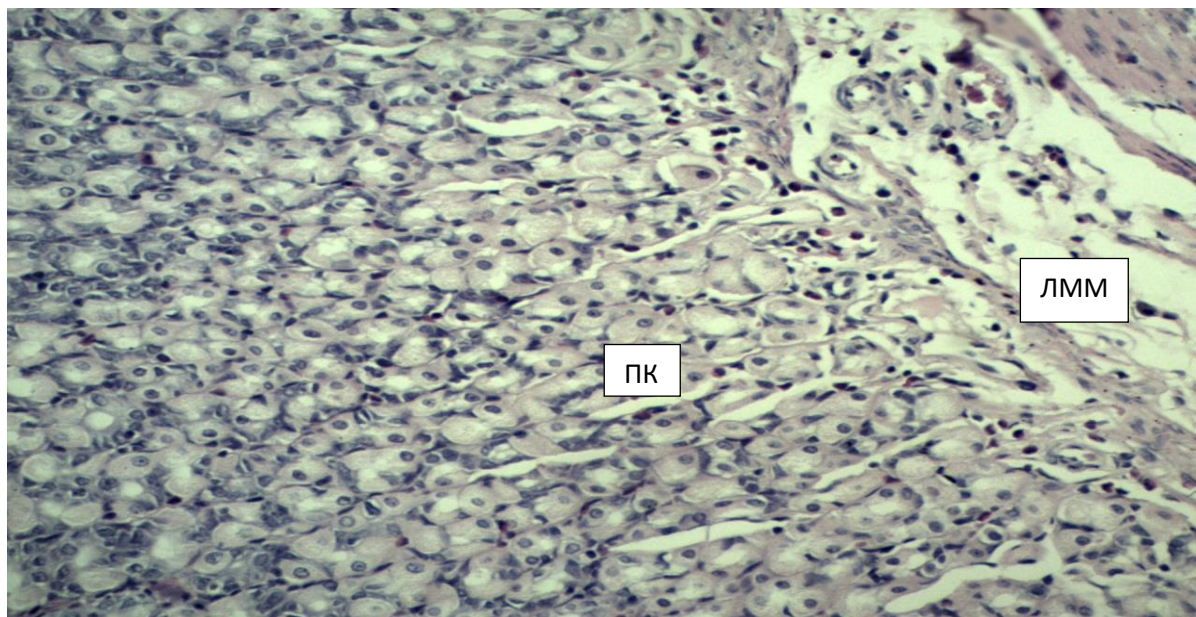
Тези автори не наблюдават промени в стомасите на плъхове, третирани с целекоксиб (Demircan et al, 2005). В контраст на тези изследвания, Sozer et al. установяват фовеоларна хиперплазия, леко възпаление, фокална атрофия и загуба на мукус от повърхностния стомашен епител у плъхове, третирани с целекоксиб (Sozer et al, 2001). При хистологични срезове от стомах на плъх (фундусна част) от контролната група, оцветени с хематоксилин-еозин, се наблюдават добре запазени и трите тунки, изграждащи стомашната стена. Епителната пластинка се визуализира като светла ивица поради изобилния слузен секрет в клетките на едноредния цилиндричен епител. Ядрата са сферични или овални и разположени в близост до базалната ламина, която е със запазена цялост. В собствената пластинка на лигавицата се наблюдават собствените жлези на стомаха, разделени от фина прослойка хлабава съединителна тъкан. Жлезите са под формата на разклонени или извити в долния си край тръбички, които са прерязани надлъжно, косо или напречно. В тях при оцветяване с хематоксилин-еозин се наблюдават няколко клетъчни популации, застъпени различно в отделните части на жлезите. В провлака на жлезите изобилства от пристенни клетки, разпръснати между слузните. Те са с овална до полигонална форма и широка основа, която заляга върху базалната ламина. Ядрото е сферично, като се откриват клетки с две или три ядра. Цитоплазмата им е подчертано еозинофилна. Слузните клетки са с неправилна форма, често са притиснати и деформирани от пристенните. Ядрото им е овално или с неправилна форма и разположено в основата им. В базалната част на жлезите е водеща популацията на главните клетки. Те са високи, различни по форма клетки. Ядрото им е най-често сферично и е в основата или центъра на клетката. Цитоплазмата е подчертано базофилна. Мускулната пластинка на лигавицата е съставена от циркулярно и надлъжно разположени снопчета гладка мускулатура, от които се отделят тънки прослойки навлизащи в собствената пластинка между жлезите. Подлигавичната основа е изградена от хлабава съединителна тъкан и добре визуализирана. Мускулната обвивка на стомашната стена е с характерен строеж и добре запазена структура. Сходни са и наблюденията на серозната обвивка. (*Фиг. 10.*)



Фиг. 10. Стомах на плъх от контролна група - фундусна част. Рутинна хистология, оцветяване с Н-Е; $\times 100$. Собствена пластинка с надлъжно и напречно прерязани собствени жлези (А - провлак на собствените жлези; В - шийка на собствените жлези; С - базална част на собствените жлези). Част от мускулната пластинка на лигавицата (ЛММ).

При тъканните проби взети от стомах на животните, третирани със съединения 1с и 2е не се наблюдават промени. Вероятният извод от тези резултати е, че съединения 1с и 2е са безопасни по отношение на стомаха, като наблюдаваната липса на засягане на стомашната лигавица може да служи като възможно потвърждение на селективност към СОХ-2. При животните, третирани със съединения 2f, 3d, 3е, 3f и 3g стомашната хистология показва преобладаваща популация на пристенните клетки, особено в базалната част на жлезите, като пристенните клетки са по-едри и с пенеста еозинофилна цитоплазма; в дъната на жлезите се откриват разширени кръвоносни съдове с леко изразена левкоцитна инфилтрация. **(Фиг. 11.)** Париеталните клетки са отговорни за секрецията на солна киселина и вътрешен фактор на Castle. Основният механизъм на уреждане на лигавицата от НСПВС се дължи на намалена концентрация на мукопротективни простагландини и съответно намалено кръвоснабдяване, намалено отделяне на мукус и бикарбонати т.е. потискане на защитните фактори. Предполага се и директна увреда на мукозата – повечето НСПВС са кисели съединения, което означава, че в киселата среда на стомаха остават в нейонизирана форма, лесно мигрират в повърхностните епителни клетки и дисоциират в йони, хващащи водородните катиони в капан (Cruyer, 2003); намаляват фосфолипидното съдържание; декуплират окислителното фосфорилиране и нарушават електронния транспорт, което води до потисната клетъчна пролиферация (Lee et al, 2011). При съединения 2f, 3d, 3е, 3f и 3g можем да говорим за увреждане на стомаха, дължащо се на хиперплазия и хипертрофия на париетални клетки, които в следствие да

довеждат до повишени агресивни фактори и добра среда за развитие на лигавична увреда.



Фиг. 11. Стомах на плъх от групата, третирана със съединение 2f 40 мг/кг т.м. - фундусна част. Рутинна хистология, оцветяване с Н-Е; x200. Базална част на собствени жлези (изобилие от пристенни клетки - ПК). Част от мускулната пластинка на лигавицата (ЛММ).

Обобщение

Всички седем съединения 1с, 2е, 2f, 3d, 3е, 3f и 3g водят до намаление в стойностите на левкоцитите. При съединения 3f и 3g се наблюдава тромбоцитопения. Съединенията 2f и 3d в най-високите тествани дози намаляват нивата на хемоглобин.

Всички седем съединения 1с, 2е, 2f, 3d, 3е, 3f и 3g водят до намаляване нивата на глюкоза. Нито едно от изследваните от нас съединения не доведе до увеличение в нивата на АсАТ и АлАТ. Съединения 2f, 3f и 3g повишават нивата на креатинин и техният нефротоксичен потенциал е потвърден хистологично.

Съединения 2f, 3d, 3е, 3f и 3g показват промени в морфологията на стомашната лигавица, изразяващи се основно в хиперплазия и хипертрофия на париетални клетки. Не се наблюдават типичните за употребата на НСПВС ерозии и улцерации. При съединения 2е, 3f, 3d, 3f, 3g се регистрират фокални изменения в бъбречния паренхим под формата на дилатирани дистални каналчета, променена морфология на мезангиалните клетки и дилатирани кръвоносни съдове. Всички седем изследвани съединения 1с, 2е, 2f, 3d, 3е, 3f и 3g показват запазена сърдечна морфология. Установяват се дилатирани кръвоносни съдове от малък калибър.

II. „ДОЗА-ЕФЕКТ” ЗАВИСИМОСТ НА АНТИНОЦИЦЕПТИВЕН ЕФЕКТ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ ПРИ ТЕСТ „ГОРЕЩА ПЛОЧА“ СЛЕД ЕДНОКРАТНО И МНОГОКРАТНО ТРЕТИРАНЕ

В достъпната литература са описани множество методики за оценка на аналгетична активност както на ново синтезирани, така и на внедрени в употреба лекарствени съединения. При ноцицептивните тестове се използват различни стимули (термичен, химичен, механичен, електрически), което позволява отдиференцирането на различни механизми и нива на осъществявана антиноцицепция (Le Bars et al, 2001) (Barrot, 2012).

Методът “гореща плоча” е стандартен избор за скрининг за аналгетична активност на ново синтезирани съединения. Наблюдаваните при този тест параметри облизване на лапата, изскачане от цилиндъра и вокализация са супраспинално интегрирани отговори (Barrot, 2012). Недостатък на този тест е, че опитните животните се премахват от плочата при показване на конкретно поведение, което може да се научи след неколкнократно провеждане на опита. Животните са много податливи на феномени на обучение, които водят до прогресивно съкращаване на реакционното време – главен критерий за осъществяваната антиноцицепция. Друг недостатък на този тест е, че се нагриват всички лапи, включително и опашката (Le Bars et al, 2001).

След еднократно третиране при тест „гореща плоча” латентното време на контролата група, изразено в секунди, е 8.70 ± 0.52 , 6.00 ± 0.43 и 8.87 ± 0.65 съответно за първи, втори и трети час. Референтният аналгетик метамизол сигнификантно удължи латенцията и на трите тествани часа, сравнено с контролата ($p < 0.05$). След многократно (14-дневно) приложение латентното време на контролата група, изразено в секунди, е 8.35 ± 1.06 , 8.93 ± 1.44 и 7.42 ± 0.54 съответно за първи, втори и трети час. Референтният аналгетик метамизол след 14-дневно приложение сигнификантно удължи реакционното време на първи и втори час, сравнено с контролата ($p < 0.05$). На **Табл. 1** са показани резултатите от проведеното изследване на пироловите съединения след еднократно и многократно приложение при тест „гореща плоча”.

Nozadze et al. установяват, че приложението на аналгин, кеторолак и ксефокам в централното ядро на амигдалата на плъхове предизвиква толерантност към тези медикаменти, както и кръстосана толерантност към морфин при тест “гореща плоча” и тест “tail flick” (Nozadze et al, 2011). Tsiklauri et al. потвърждават тези резултати, като тези автори наблюдават развитие на толерантност и при приложението на аналгин, кеторолак и ксефокам интраперитонеално (Tsiklauri et al, 2010). Tortorici et al. установяват, че приложението на метамизол във вентролатералната

периакведуктална сива зона на плъхове води до антиноцицепция при тест “гореща плоча”.

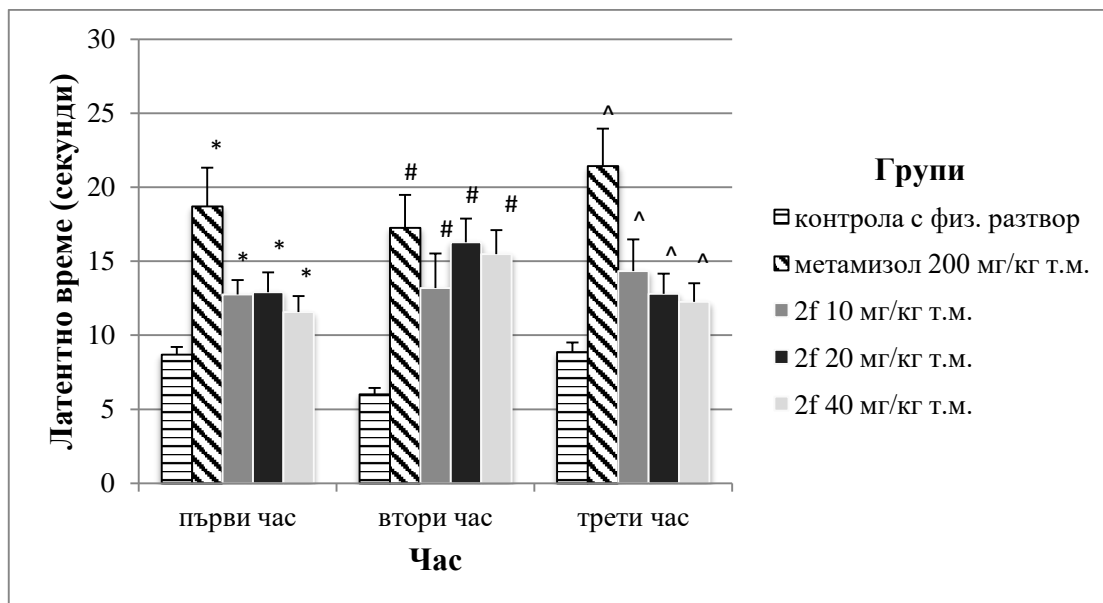
Табл. 1. Дози на изследваните пиролови съединения, при които се установява достоверен аналгетичен ефект при тест „гореща плоча“ след еднократното и многократното им приложение.

Изследвано съединение	Доза, показала достоверен аналгетичен ефект при еднократно третиране	Доза, показала достоверен аналгетичен ефект при многократно третиране
1c	20 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	
2e	10 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	
2f	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	
3d	20 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
3e	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
3f	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
		40 мг/кг т.м.
3g	-	-

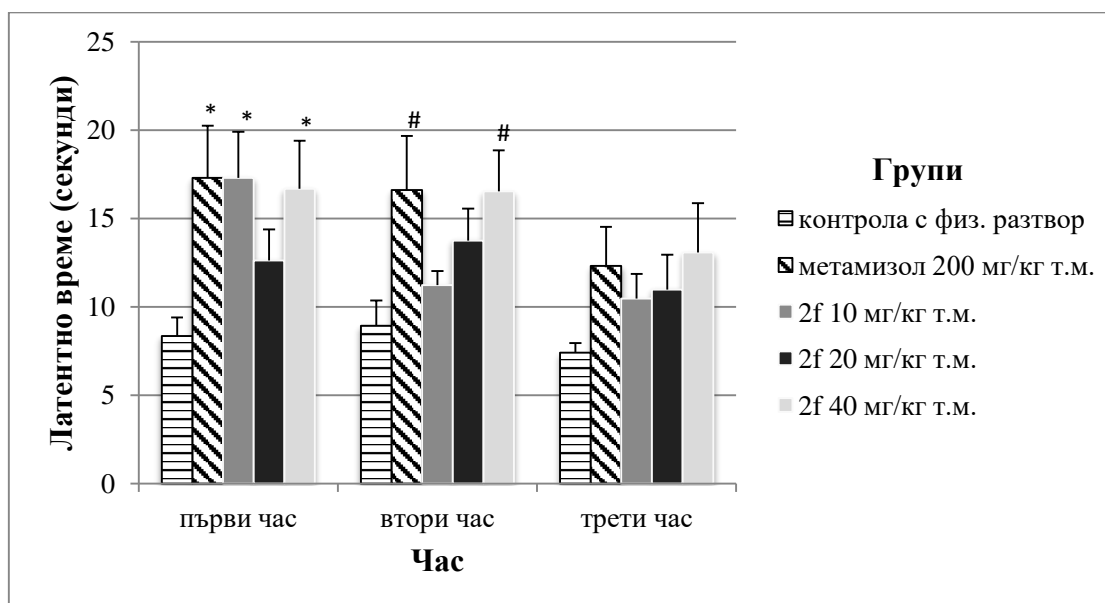
След двудневно приложение метамизол индуцира толерантност, като плъховете показват толерантност и към морфин, и показват симптоми на отнемане при системно приложение на налоксон. Тези резултати предполагат, че метамизолът активира ендогенни опиоидни системи и че неопиоидните аналгетици могат да доведат до опиоидна толерантност и риск от синдром на отнемане чрез действие върху централната нервна система (Tortoricci et al, 2000). В изследване на Tsagareli et al. отново е установено, че повторното микроинжектиране на аналгин, клодифен, кеторолак и ксефокам в централното ядро на амигдалата, периакведукталното сиво вещество на средния мозък и роstralната вентромедиална медула на плъхове води до постепенно намаление в антиноцицепцията, изразено с намаление в латентното време при тест “гореща плоча” и тест “tail flick” (Tsagareli et al, 2011). Тези данни са сходни с наблюденията на други автори. Толерантността към метамизол е

придружена от кръстосана толерантност към морфин, като получената аналгезия се атенюира от опиоидния антагонист налоксон. В допълнение към стимулирането на освобождаване на ендогенни опиоиди, последни доказателства на клетъчно ниво предполагат, че НСПВС могат също да усилят сигналния път, използван от опиати. Съвместното прилагане на НСПВС потенцира инхибирането на ГАМК-освобождаването от морфин, въпреки че НСПВС нямат ефект върху освобождаването на ГАМК при отсъствие на морфин. Вероятно обяснение на механизма на повишена аналгезия при съвместно приложение на опиоиди и НСПВС е, че блокирането на СОХ отклонява метаболизма на арахидоновата киселина към липоксигеназните пътища и така увеличава ефикасността на опиоидните рецепторни агонисти. Точният молекулен механизъм на толерантност към НСПВС все още не е известен, но толерантността към НСПВС имитира опиоидната толерантност (Tsagareli et al, 2011). Сходни резултати за наличие на антиноцицепция при тест “гореща плоча” и развитие на толерантност към НСПВС получават редица автори. Domeg провежда опити с интраперитонеално приложение на кеторолак върху мишки, използвайки тестове “гореща плоча” и “tail flick”. Кеторолак показва сигнификантен аналгетичен ефект и при двата метода, като системното приложение на налоксон намалява аналгетичната му активност (Domeg, 1990). Björkman установява, че интраперитонеалното приложението на диклофенак у плъхове води до антиноцицепция при висцерални болкови модели, но не и при модели за соматосензорна болка (тест “гореща плоча” и тест “tail flick”). Антиноцицептивният ефект на диклофенак отслабва при системно приложение на налоксон (Björkman, 1995). Lu et al. установяват сигнификантен аналгетичен ефект на целекоксиб и две негови производни у плъхове, проявен при тест “гореща плоча”, тест “tail flick” и формалинов тест (Lu et al, 2006). Интерес представляват наблюденията на Akman et al., които не установяват аналгетичен ефект на метамизол у мишки при тестове “гореща плоча” и “tail flick”. Вероятно обяснение за наблюдаваните разлики е методът на приложение на метамизол, който в случая е субкутанен, както и в използваните различни животински видове (Akman et al, 1996).

При тест гореща плоча съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e и 3f показват аналгетичен ефект. (Фиг. 12.) Поведенческите прояви при този тест са супраспинално интегрирани отговори, следователно в антиноцицепцията, оказвана от изследваните съединения участват супраспинални пътища (Barrot, 2012). При съединения 1c и 2f след 14-дневно приложение аналгетичният ефект се наблюдава само в един от тестваните часове и е възможно да се касае за развитие на толерантност към аналгетичното им действие. (Фиг. 13.) Друго възможно обяснение за липсата на аналгетична активност след многократно приложение е характерният феномен на обучение за модел “гореща плоча”.



Фиг. 12. Ефект на съединение 2f в дози 10, 20 и 40 мг/кг т.м. върху ноцицептивния праг при тест „гореща плоча” и еднократно приложение. * $p < 0.05$ сравнено с контрола на първи час; # $p < 0.05$ сравнено с контрола на втори час; ^ $p < 0.05$ сравнено с контрола на трети час.



Фиг. 13. Ефект на съединение 2f в дози 10, 20 и 40 мг/кг т.м. върху ноцицептивния праг при тест „гореща плоча” и многократно приложение. * $p < 0.05$ сравнено с контрола на първи час; # $p < 0.05$ сравнено с контрола на втори час.

III. „ДОЗА-ЕФЕКТ” ЗАВИСИМОСТ НА АНТИНОЦИЦЕПТИВЕН ЕФЕКТ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ ПРИ ПЛАНТАРЕН ТЕСТ СЛЕД ЕДНОКРАТНО И МНОГОКРАТНО ТРЕТИРАНЕ

При гореща плоча се наблюдават разлики в аналгетичния ефект на съединенията след еднократно и многократно приложение. За потвърждаване и допълнение на получените резултати ние използвахме плантарен тест. Плантарният тест е по-чувствителен метод, отново базиран

на поведенчески реакции, опосредствани от супраспинални механизми. Той е разработен с цел по-голяма точност на резултатите. При този тест се използва локализиран източник на топлина като термичният стимул се прилага само върху лапата на изследваното животно (Gregory et al, 2013). Друго преимущество на плантарния тест е автоматичното засичане на латентното време. Предимство на плантарния тест е и липсата на конкретна подсказка за създаване на условен рефлекс т.е. животните не могат да заучат какво поведение прекъсва теста и резултатите са по-надеждни (Le Bars et al, 2001).

След еднократно третиране при плантарния тест времето за отдръпване на лапата в секунди на контролната група е 6.75 ± 0.48 , 8.67 ± 2.34 и 10.00 ± 2.10 съответно за първи, втори и трети час. При плантарния тест след четиринадесетдневно приложение времето за отдръпване на лапата в секунди на контролната група е 7.13 ± 1.42 , 7.70 ± 1.72 и 7.17 ± 2.22 съответно за първи, втори и трети час. При групата, третирана с метамизол след еднократно и многократно приложение се наблюдава статистически значимо удължаване на реакционното време на първи, втори и трети час, сравнено с контролната група ($p < 0.05$). На **Табл. 2** са показани резултатите от проведеното изследване на пироловите съединения след еднократно и многократно приложение при плантарен тест.

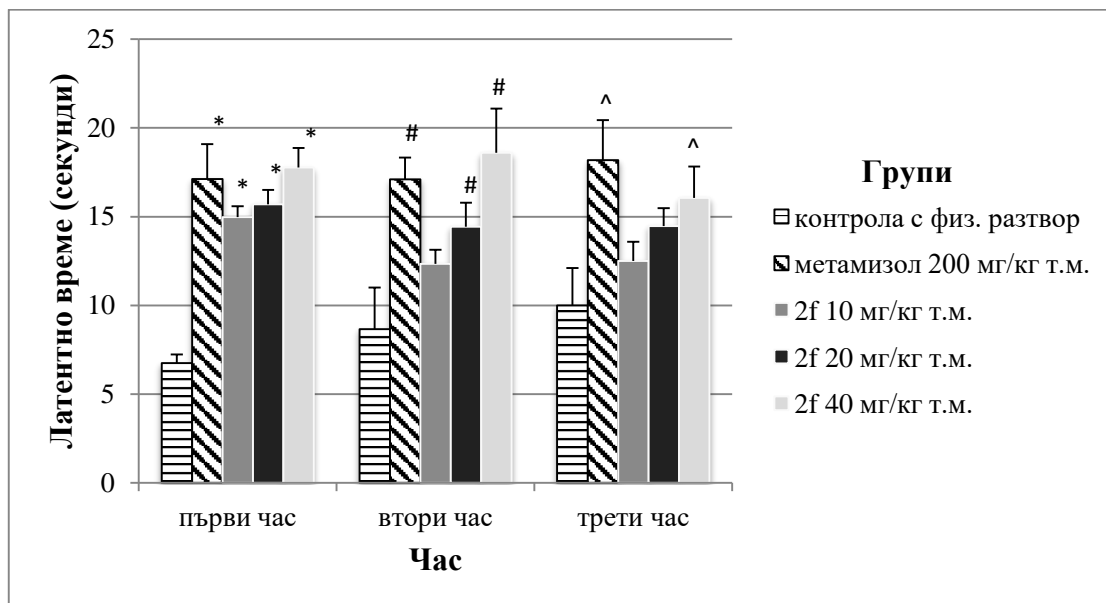
При миши модел на рак Brito et al. установяват, че интраперитонеалното приложение на метамизол 270 мг/кг т.м. увеличава времето за отдръпване на лапата при плантарен тест. Този антиноцицептивен ефект прогресивно намалява, като на седемнадесетия ден резултатите от теста показват стойности, подобни на контролната група (Brito et al, 2016). El-Awdan et al. показват, че приложението на мелоксикам предизвиква значително повишаване на времето, необходимо на плъховете да реагират на термичната стимулация при плантарен тест (El-Awdan et al, 2015). De Rienzo-Madero et al. изследват времето за отдръпване на лапата при плантарен тест на плъхове, третирани с целекоксиб след индуциране на локален остър възпалителен процес с карагенин. Целекоксиб в ниски дози (0.13 и 1.3 мг/кг т.м., интраперитонеално) води до намаляване на ноцицептивния отговор (De Rienzo-Madero et al, 2013). При плантарен тест съединения 1с, 2е, 2f, 3d, 3е и 3f показват достоверен аналгетичен ефект. (**Фиг. 14, 15.**) Поведенческите прояви при плантарен тест се медиират от супраспинални пътища както при тест “гореща плоча” (Barrot, 2012), което потвърждава, че те са част от антиноцицепцията, оказвана от изследваните съединения. Съединения 1с и 2f, при които не се наблюдава ефект при тест “гореща плоча” след 14-дневно приложение, показват аналгетично действие при плантарен тест след многократно приложение.

Табл. 2. Дози на изследваните пиролови съединения, при които се установява достоверен аналгетичен ефект при плантарен тест след еднократното и многократното им приложение.

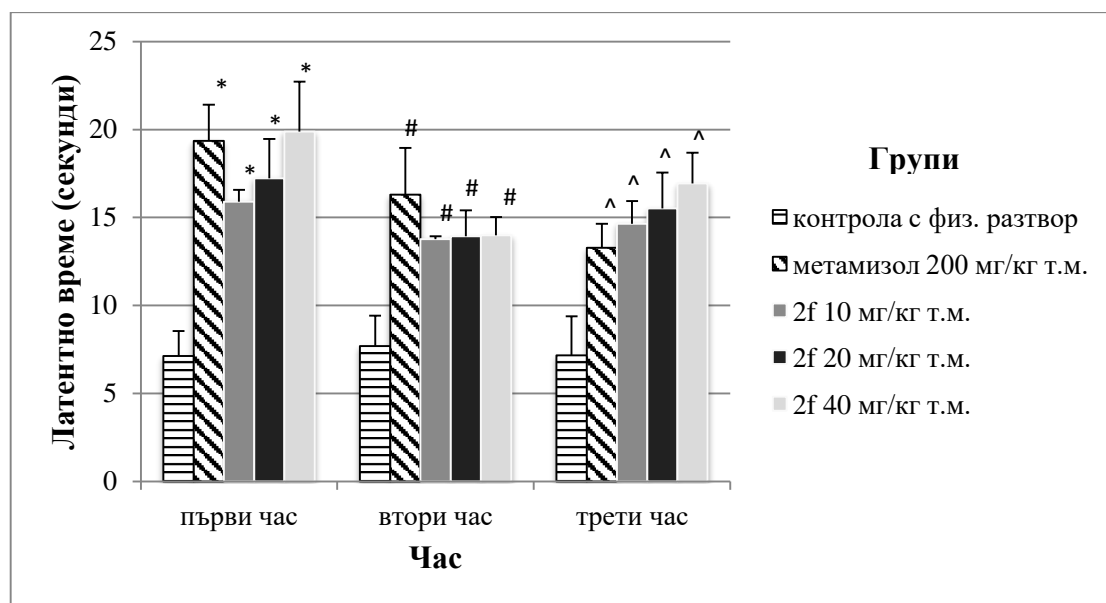
Изследвано съединение	Доза, показала достоверен аналгетичен ефект при еднократно третиране	Доза, показала достоверен аналгетичен ефект при многократно третиране
1c	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
2e	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
2f	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
3d	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
3e	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
3f	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
3g	-	-

Като се вземат под внимание особеностите на съответните методи, можем да заключим, че толерантност към аналгетичния ефект на съединения 1c и 2f не се развива, а липсата на достоверна аналгезия при тест “гореща плоча” след многократно приложение на 1c и 2f се дължи на различната степен на чувствителност при отчитане на резултатите в сравнение с тази на плантарния тест. При съединения 1c, 2e и 2f аналгетичният ефект при плантарен тест след 14-дневно приложение се наблюдава на всички тествани часове, за разлика от ефектът след еднократно, т.е. е възможно да се наблюдава кумулация на съединенията и осъществяване на по-надеждна инхибиция на СОХ. Видът на кумулацията трябва да се установи с последващи изследвания на фармакокинетични показатели. Въз основа на данни от достъпната литература, киселинни НСПВС с кратък полуживот и дозиране на интервал над 8 ч. позволяват

възстановяване на вазодилатативни простагландини. При хистологични изследвания на сърце на експериментални животни, третирани с изследваните съединения е установена вазодилатация. Посочените данни от литературата и нашите изследвания ни дават основание да обсъждаме наблюдаваните промени като резултат на функционална кумулация.



Фиг. 14. Ефект на съединение 2f в дози 10, 20 и 40 мг/кг т.м. върху ноцицептивния праг при плантарен тест и еднократно приложение. * $p < 0.05$ сравнено с контрола на първи час; # $p < 0.05$ сравнено с контрола на втори час; ^ $p < 0.05$ сравнено с контрола на трети час.



Фиг. 15. Ефект на съединение 2f в дози 10, 20 и 40 мг/кг т.м. върху ноцицептивния праг при плантарен тест и многократно приложение. * $p < 0.05$ сравнено с контрола на първи час; # $p < 0.05$ сравнено с контрола на втори час; ^ $p < 0.05$ сравнено с контрола на трети час.

IV. „ДОЗА-ЕФЕКТ” ЗАВИСИМОСТ НА АНТИНОЦИЦЕПТИВЕН ЕФЕКТ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ ПРИ ТЕСТ „TAIL FLICK“ СЛЕД ЕДНОКРАТНО И МНОГОКРАТНО ТРЕТИРАНЕ

При “tail flick” тестът също се използва термичен стимул. Този тест се счита за прецизен, тъй като се измерва електронно и има малка вариабилност в реакционните времена между отделните животни (Le Bars et al, 2001). Това позволява да оценим намесата на различни пътища в аналгетичния ефект на съединенията. При този метод наблюдаваният рефлекторен отговор на ноцицептивния стимул се осъществява на ниво гръбначен мозък (Barrot, 2012). Недостатък на „tail flick” теста е, че мястото на стимулиране на опашката е от значение за ефекта, като дисталната част е най-чувствителната област (Yoburn et al, 1984) и малки отклонения в нагряваната област могат до доведат до промени в латентното време.

След еднократно приложение при тест „tail flick” времето за отдръпване на опашката на контролата група, изразено в секунди, е 3.33 ± 0.22 , 2.58 ± 0.10 и 3.17 ± 0.45 съответно за първи, втори и трети час. При тест „tail flick” след многократно третиране времето за отдръпване на опашката на контролата група, изразено в секунди, е 3.50 ± 0.70 , 2.70 ± 0.25 и 3.93 ± 0.48 съответно за първи, втори и трети час. Референтният аналгетик метамизол след еднократно и многократно приложение достоверно удължи латентното време на първи и втори час, сравнено с контролата ($p < 0.05$). На **Табл. 3** са показани резултатите от проведеното изследване на пироловите съединения след еднократно и многократно приложение при тест „tail flick”.

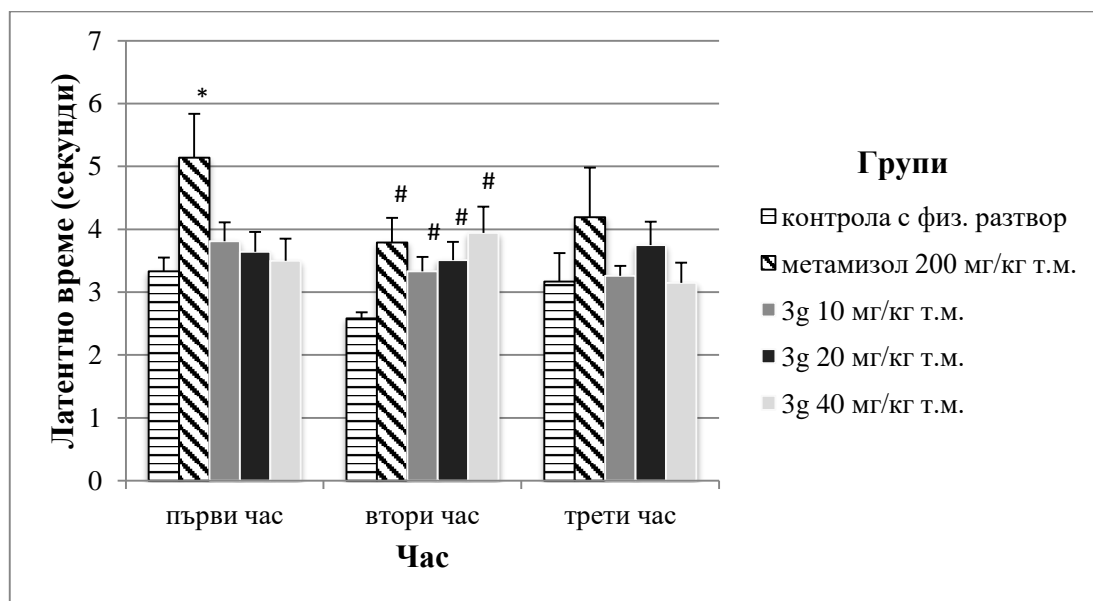
Dogrul et al. установяват, че локалното, но не системно, прилагане на НСПВС предизвиква антиноцицепция при “tail flick” теста у плъхове. Ендогенната опиоидна система допринася за периферните антиноцицептивни ефекти на метамизол, но не и на диклофенак, кеторолак и натриев салицилат, което предполага разлики в механизмите на действие на НСПВС (Dogrul et al, 2007). В контраст на тези резултати, Carlsson et al. намират, че интраперитонеалното (в дози 10, 20 и 40 мг/кг т.м.) и интратекалното (дози 50 до 400 микрограма) приложение на метамизол на плъхове води до дозозависимо удължаване на времето за отдръпване на опашката (Carlsson et al, 1986). Nishiyama et al. установяват, че целекоксиб не проявява ефект при “tail flick” теста след интратекално приложение на плъхове (Nishiyama et al, 2006). Lu et al. обаче наблюдават сигнификантен аналгетичен ефект на целекоксиб и две негови производни (Lu et al, 2005).

Табл. 3. Дози на изследваните пиролови съединения, при които се установява достоверен аналгетичен ефект при тест „tail flick“ след еднократното и многократното им приложение.

Изследвано съединение	Доза, показала достоверен аналгетичен ефект при еднократно третиране	Доза, показала достоверен аналгетичен ефект при многократно третиране
1c	10 мг/кг т.м.	-
2e	40 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м. 40 мг/кг т.м.
2f	-	-
3d	10 мг/кг т.м. 20 мг/кг т.м. 40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
3e	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
3f	10 мг/кг т.м.	-
3g	10 мг/кг т.м. 20 мг/кг т.м. 40 мг/кг т.м.	-

При тест “tail flick” съединения 1c, 2e, 3d, 3e, 3f и 3g показват аналгетичен ефект. Рефлексът на отдръпване на опашката при тест “tail flick” е спинално интегриран отговор (Barrot, 2012), следователно спинални механизми имат намеса в антиноцицепцията, оказвана от изследваните съединения. След еднократно приложение на съединение 1c най-ниската доза показва аналгетичен ефект само на първи час; след многократно приложение субстанцията не променя латентното време. При съединение 2e аналгетичният ефект след продължително приложение се появява при по-ниска доза, подобно на резултатите от плантарен тест. Потвърждава се хипотезата за кумулация на съединението. След еднократно приложение съединения 3d, 3f и 3g показват сигнификантен аналгетичен ефект, който не се наблюдава след многократното им приложение. (**Фиг. 16.**) При обсъждането на представените резултати може да се допусне развитие на толерантност към аналгетичния ефект на съединения 3d, 3f и 3g на спинално ниво. Според Gårdmark et al. повишени времена на отдръпване на опашката, толерантност и антиноцицепция на ниво гръбначен мозък са много типични за опиоидите (Gårdmark et al., 1998). Регистрираните от нас резултати за съединения 3d, 3f и 3g, както и сходството им с тези на Gårdmark et al. ни дава основание да обсъдим включването на ендогенната опиоидергична система в аналгезията, предизвикана от тези съединения. Включването на тази система в

антиноцицепцията, предизвикана от НСПВС, се подкрепя от данни от скорошни изследвания, които хипотезират, че ГАМК-съдържащите синапси играят ролята на място, където НСПВС конвертират с ендогенните опиоиди. Многократно интраперитонеално приложение на неопиоидни аналгетици при плъхове индуцира антиноцицепция и предизвиква толерантност, както и толерантност към морфин (Tsagareli et al, 2011). Прилагането на налоксон (специфичен μ -рецепторен опиоиден антагонист) значително намалява антиноцицептивните ефекти на НСПВС (Tsagareli et al, 2011). Съединение 2f не показва аналгетична активност при този тест, което означава, че антиноцицепцията, оказвана от това съединение не се дължи на включването на спинални рефлексии.



Фиг. 16. Ефект на съединение 3g в дози 10, 20 и 40 мг/кг т.м. върху ноцицептивния праг при тест „tail flick” и еднократно приложение. * $p < 0.05$ сравнено с контрола на първи час; # $p < 0.05$ сравнено с контрола на втори час.

V. „ДОЗА-ЕФЕКТ” ЗАВИСИМОСТ НА АНТИНОЦИЦЕПТИВЕН ЕФЕКТ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ ПРИ ТЕСТ НА RANDALL & SELITTO СЛЕД ЕДНОКРАТНО И МНОГОКРАТНО ТРЕТИРАНЕ

При тестът на Randall & Selitto отдръпването на лапата в резултат на механичен натиск е рефлексна реакция на ниво гръбначен мозък. Тази рефлексна реакция в някои експерименти е съпроводена с поведенчески прояви, медириани от супраспинални структури като опит за избягване и вокализация. (Le Bars et al, 2001). Недостатък на теста е намесата на субективни фактори (изследователят, който провежда опита) и физическата ограниченост на опитните животни. Посочените недостатъци намаляват надежността на получените резултати при използването на този тест.

След еднократно третиране при теста на Randall & Selitto силата на натиска, представена като g/cm^2 , при която животните от контролната

група отдръпват лапата си е 7.17 ± 0.74 , 6.75 ± 0.76 и 6.67 ± 1.03 съответно за първи, втори и трети час. Групата, третирана с метамизол сигнификантно увеличи изследвания показател на първия час, сравнено с контролната група ($p < 0.05$). След 14-дневно приложение силата на натиска, представена като $\text{г}/\text{см}^2$, при която животните от контролната група отдръпват лапата си е 7.00 ± 1.21 , 6.58 ± 0.86 и 6.08 ± 0.72 съответно за първи, втори и трети час. Групата, третирана 14 дни с метамизол незначително увеличи изследвания показател при сравнение с резултатите на контролната група животни. На **Табл. 4** са показани резултатите от проведеното изследване на пироловите съединения след еднократно и многократно приложение при тест на Randall & Selitto.

Табл. 4. Дози на изследваните пиролови съединения, при които се установява достоверен аналгетичен ефект при тест на Randall & Selitto след еднократното и многократното им приложение.

Изследвано съединение	Доза, показала достоверен аналгетичен ефект при еднократно третиране	Доза, показала достоверен аналгетичен ефект при многократно третиране
1c	-	-
2e	-	-
2f	-	-
3d	-	-
3e	40 мг/кг т.м.	-
3f	-	20 мг/кг т.м.
3g	-	-

Bocheva et al. установяват значителна аналгетична активност на шест ново синтезирани пиролови производни след интраперитонеално и перорално приложение на плъхове с тест аналгезиметър (Bocheva et al, 2006). Според Alves et al. диклофенак показва дозозависим антиноцицептивен ефект при теста на Randall & Selitto само след неговото локално приложение в тестваната лапа. Единствено по-високи дози на диклофенак проявяват ефект след системно приложение (Alves et al, 2004). При теста на Randall & Selitto съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3g не показват аналгетичен ефект. Съединения 3e и 3f показват аналгетична активност, но само в една доза, в един от изследваните часове. Рефлексът на отдръпване на лапата при този тест се осъществява предимно на периферно ниво (Barrot, 2012). Можем да заключим, че периферни механизми не участват в оказваната от съединенията антиноцицепция. Причините за липса на аналгетичен ефект при използването на този тест могат да се търсят в структурата на изследваните съединения и в дозата, които се използват в нашия експеримент. Това обяснява и различието в получените от нас

результати и тези на Bocheva et al. Данните от нашето проучване ни дават основание да изключим този модел като подходящ за изследване на аналгетично действие при съединения с конкретната пиролова структура, която ние изследваме.

VI. „ДОЗА-ЕФЕКТ” ЗАВИСИМОСТ НА АНТИНОЦИЦЕПТИВЕН ЕФЕКТ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ ПРИ ФОРМАЛИНОВ ТЕСТ СЛЕД ЕДНОКРАТНО И МНОГОКРАТНО ТРЕТИРАНЕ

Формалиновият тест е подходящ модел за изясняване на потенциалното участие на периферни и спинални пътища в модулацията на болкова трансмисия. Интраплантарното въвеждане на формалин води до появата на бифазна болка (Meunier et al, 1998). Двете фази се дължат на различни по характер и ниво промени, което позволява да се правят изводи и за различни механизми в оказваната антиноцицепция. Първата фаза е резултат от директно активиране на периферните ноцицептори и трае приблизително 10 минути. Втората фаза започва след десет минутен период на покой. Тя се дължи на освобождаването на локални ендогенни провъзпалителни медиатори, предизвиквайки периферни възпалителни процеси и последваща сенсибилизация на ноцицептивни спинални неврони (Meunier et al, 1998).

След еднократно приложение при формалиновия тест времето за близане на лапата в секунди за животните от контролната група е 70.17 ± 16.81 и 47.83 ± 11.12 съответно за първа и втора фаза на теста. След многократно третиране времето за близане на лапата в секунди за животните от контролната група е 42.00 ± 9.36 и 35.00 ± 5.22 съответно за първа и втора фаза на теста. Групата, третирана с метамизол достоверно редуцира времето за близане на лапата в първа и втора фаза на теста, сравнено с контролната група ($p < 0.05$) както след еднократно, така и след многократно приложение. На **Табл. 5** са показани резултатите от проведеното изследване на пироловите съединения след еднократно и многократно приложение при формалинов тест.

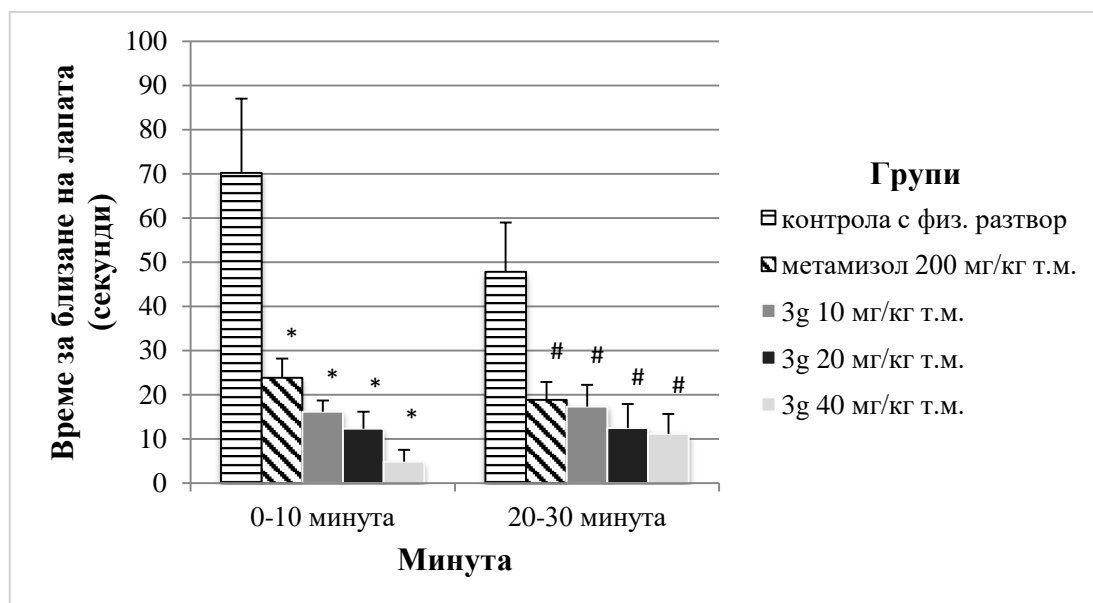
Lu et al. наблюдават сигнификантен аналгетичен ефект на целекоксиб и две негови производни при формалинов тест при плъхове (Lu et al, 2005). Nishiyama et al. също установяват дозозависимо намаление във времето за близане на лапата и в двете фази на теста след интратекално приложение на целекоксиб (Nishiyama et al, 2006). В експериментално проучване на Torres-Lopez et al. опитните плъхове се третират предварително локално с физиологичен разтвор, целекоксиб, диклофенак или ресвератрол, последвани от 50 мкл 1% или 5% формалин. Периферното приложение на целекоксиб не води до антиноцицепция при нито една от двете концентрации на формалин. За разлика от него, диклофенак и ресвератрол предизвикват дозозависим антиноцицептивен ефект във втората фаза на теста (Torres-Lopez et al, 2002).

Табл. 5. Дози на изследваните пиролови съединения, при които се установява достоверен аналгетичен ефект при формалинов тест след еднократното и многократното им приложение.

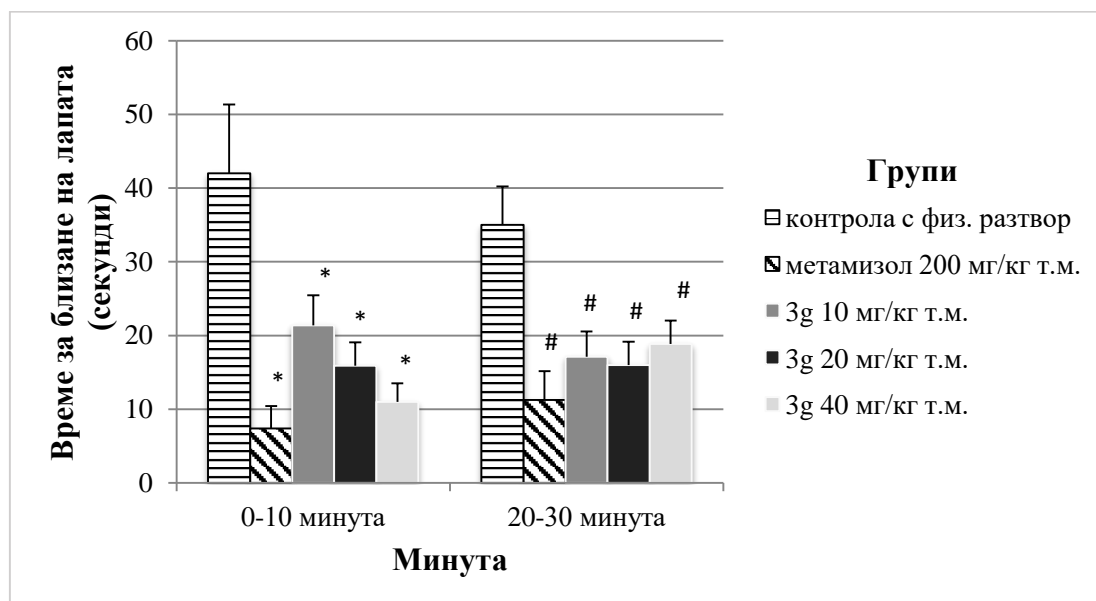
Изследвано съединение	Доза, показала достоверен аналгетичен ефект при еднократно третиране	Доза, показала достоверен аналгетичен ефект при многократно третиране
1c	20 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	
2e	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
2f	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
3d	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
3e	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
3f	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
3g	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.

Lozano-Cuenca et al. установяват, че локално или интратекално приложение на лумиракоксиб води до дозозависима антиноцицепция само във втората фаза на формалиновия тест при плъхове (Lozano-Cuenca et al, 2005). Beirith et al. наблюдават, че метамизол инжектиран интраперитонеално или субплантарно води до дозозависими антиноцицепция в първа и втора фаза на формалиновия тест у мишки (Beirith et al, 1998). При опити върху мишки Hunskaar et al. установяват, че морфин, кодеин, нефопам и орфенадрин, като централно действащи аналгетици, показват антиноцицепция и двете фази на формалиновия тест. Индометацин и напроксен, както и ГКС дексаметазон и хидрокортизон потискат близането на лапата само във втора фаза, докато аспирин и

парацетамол са антиноцицептивни и в двете фази (Hunnskaar et al, 1987). При формалиновия тест всички съединения 1с, 2е, 2f, 3d, 3е, 3f и 3g показват аналгетичен ефект и в двете фази на теста. (Фиг. 17, 18.)



Фиг. 17. Ефект на съединение 3g в дози 10, 20 и 40 мг/кг т.м. върху ноцицептивния праг в двете фази на формалинов тест и еднократно приложение. * $p < 0.05$ сравнено с контрола на 0-10 минута; # $p < 0.05$ сравнено с контрола на 20-30 минута.



Фиг. 18. Ефект на съединение 3g в дози 10, 20 и 40 мг/кг т.м. върху ноцицептивния праг в двете фази на формалинов тест и многократно приложение. * $p < 0.05$ сравнено с контрола на 0-10 минута; # $p < 0.05$ сравнено с контрола на 20-30 минута.

Антиноцицепцията в първа фаза се дължи на периферни механизми, т.е. те са част от оказваната от съединенията антиноцицепция. Аналгетичният ефект във втора фаза се дължи на участието на спинални пътища и/или на потискане на провъзпалителни медиатори (Meunier et al, 1998). Използването на 5 модела за изследване на аналгетично действие ни

позволява да обсъждаме по-задълбочено и обосновано нивата на модулация на болковата трансмисия. Съединения 1c и 2f не показват антиноцицепция при тест “tail flick”, следователно при тях обезболяващият ефект във втора фаза се дължи единствено на потискане на про-инфламаторни медиатори. Съединения 3d, 3f и 3g проявяват аналгетична активност при “tail flick” теста само след еднократно приложение. Тъй като съединенията проявяват аналгетичен ефект във втора фаза на формалиновия тест и след многократно приложение, това означава, че потискането на проинфламаторни медиатори играе роля в оказваната от тези съединения антиноцицепция.

VII. „ДОЗА-ЕФЕКТ” ЗАВИСИМОСТ НА ПРОТИВОВЪЗПАЛИТЕЛЕН ЕФЕКТ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ ПРИ КАРАГЕНИНОВ МОДЕЛ НА ВЪЗПАЛЕНИЕ СЛЕД ЕДНОКРАТНО И МНОГОКРАТНО ТРЕТИРАНЕ

Карагенин-индуцираното възпаление, първоначално описано от Winter, е остро, немунно, добре проучено и лесно възпроизводимо. Експерименталният карагенин-индуциран оток при плъхове и остро ексудативно възпаление при хора притежават сходства в съдовите и клетъчните реакции. Предизвиканото от карагенин възпаление притежава две отделни фази - съдова и клетъчна (Kostadinov et al, 2014). Брадикинин, серотонин, хистамин и няколко провъзпалителни цитокини (TNF- α , IL-1 β) са отговорни за вазодилатацията и първоначалната екстравазация през първите няколко часа. Простаноиди и кинини играят основна роля в клетъчната фаза, която настъпва приблизително 4 часа след интраплантарното въвеждане на карагенин (Meshram et al, 2016). Ейкозаноидите стимулират хемотаксиса на неутрофилите и индуцират биосинтезата на еластаза, колагеназа и други съединения. Тези ензими разграждат структурните протеини до пептиди. В следствие се увеличават съдовата пропускливост и хидростатичното налягане, което води до оток и миграция на неутрофили до увредената тъкан (Fachini-Queiroz et al, 2012). COX-2 играе решаваща роля в производството на цитокини и освобождаването на простаноидни медиатори. Установено е, че инхибирането на карагенин-индуцираното възпаление е индикативно за противовъзпалително лекарствено действие при човешки възпалителни заболявания и дозите на НСПВС в този модел корелират добре с ефективната им доза при пациенти (Morris, 2004). Това прави модела особено подходящ за регистриране на противовъзпалителен ефект на нови вещества с потенциален механизъм на действие инхибиране на COX.

При карагениновия модел на възпаление диклофенак, използван като референтно вещество с антиинфламаторно действие, сигнификантно редуцира предизвикания оток на лапата на четирите изследвани часа, сравнено с контролната група след еднократно и многократно третиране.

На **Табл. 6** са показани резултатите от проведеното изследване на пироловите съединения след еднократно и многократно приложение при карагенинов модел на възпаление.

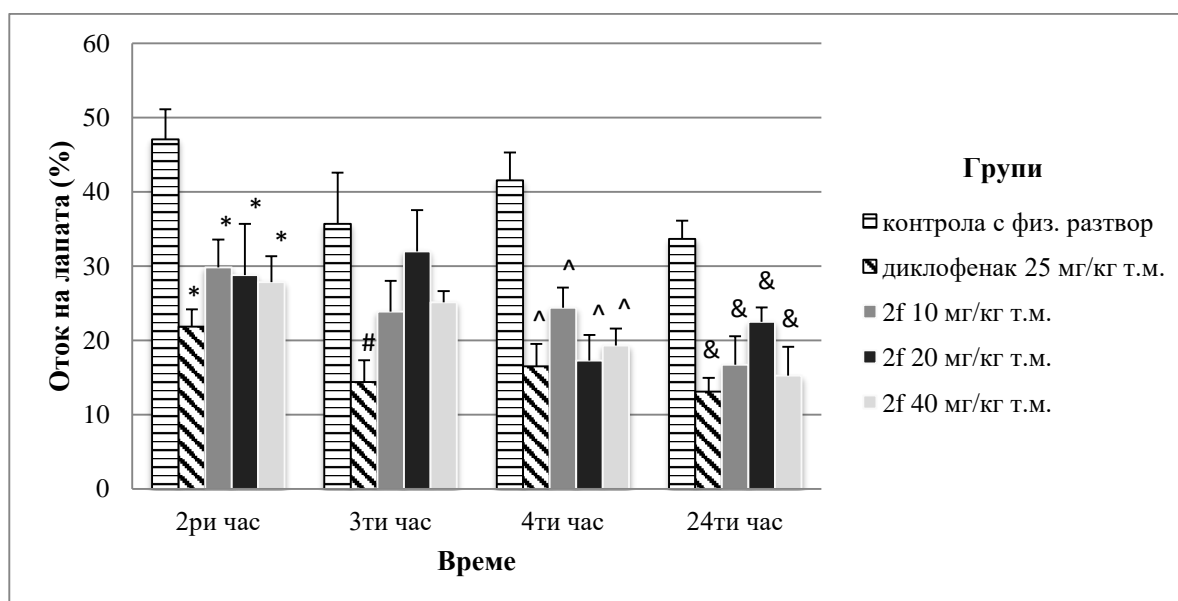
Табл. 6. Дози на изследваните пиролови съединения, при които се установява достоверен противовъзпалителен ефект при карагенинов модел след еднократното и многократното им приложение.

Изследвано съединение	Доза, показала достоверен противовъзпалителен ефект при еднократно третиране	Доза, показала достоверен противовъзпалителен ефект при многократно третиране
1c	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
		40 мг/кг т.м.
2e		10 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
		40 мг/кг т.м.
2f	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.
3d	-	10 мг/кг т.м.
		20 мг/кг т.м.
		40 мг/кг т.м.
3e		10 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
		40 мг/кг т.м.
3f		10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
		40 мг/кг т.м.
3g	10 мг/кг т.м.	10 мг/кг т.м.
	20 мг/кг т.м.	20 мг/кг т.м.
	40 мг/кг т.м.	40 мг/кг т.м.

В експериментално проучване на 1,3,4-тиадиазоли, съдържащи пиролово ядро, Maddila et al. установяват, че те проявяват сигнификантна противовъзпалителна активност при възпалителен модел с карагенин (Maddila et al, 2012). Mohamed et al. изследват пиролови производни за противовъзпалителна активност и регистрират антиинфламаторен ефект подобен на този, показан от ибупрофен, използван като позитивна

контрола (Mohamed et al, 2010). Bijev et al. и Lessigiarska et al. в подобни проучвания на нови пиролови съединения установяват, че те значително инхибират отока на лапата, показвайки противовъзпалително действие дори по-голямо от индометацин, който е използван като референтно лекарство (Lessigiarska et al, 2005) (Bijev et al, 2006). Viava et al. установяват, че 1,5-диапиролови производни приложени перорално показват висока антиинфламаторна активност при карагенинов модел на възпаление, като един час след приложението им се наблюдава пълна ремисия на предизвикания оток (Viava et al, 2008). Cong et al. регистрират показват значим противовъзпалителен ефект на напроксен и индометацин при модел на възпаление с карагенин, който ефект се наблюдава до петия час след инжектирането им. Инхибиция на едема не се наблюдава на по-късен час и при двете лекарства (Cong et al, 2015). Takayama et al. в експериментално проучване на противовъзпалителна активност на диклофенак, фелбинак и индометацин, приложени като пластири, установяват, че диклофенак показва по-силна противовъзпалителна активност спрямо другите две лекарствени средства (Takayama et al, 2011). Прието е, че диклофенак преференциално се натрупва в мястото на възпаление и проявява висока ефективност при инхибиране производството на PGE₂ в сравнение с индометацин и други НСПВС. Известно е, че рН в увредени, възпалени тъкани се понижава поради киселинни вещества, които се освобождават от стимулираните клетки и мигриращите левкоцити в комбинация с директно активиране на сензорни невронни катиони, участващи в болковото усещане. Установено е, че транскрипцията на киселинно-чувствителен йонен канал (ASIC) на сензорните неврони се увеличава в мястото на възпаление *in vivo*, тъй като индуциращите възпаление медиатори като NGF, серотонин, интерлевкин-1, брадикинин и т.н. се освобождават поради вътретъканна ацидоза. Съществуват четири изоформи на този йонен канал като активността на ASIC3 се блокира от диклофенак, докато индометацин не я повлиява (Takayama et al, 2011). Според Pinheiro et al. селективните COX-2 инхибитори целекоксиб и рофекоксиб, за разлика от индометацин, притежават слаба противовъзпалителна активност след еднократно приложение, въпреки че в експериментални условия намаляват карагениновия оток (Pinheiro et al, 2002). Сходни са резултатите на Francischi et al., които регистрират слаба анти-едематогенна активност на селективните COX-2 инхибитори при карагениновия модел на възпаление (Francischi et al, 2002). При съединения 1c, 2e, 3e след еднократно приложение се наблюдава потискане на отока в най-високите използвани дози, докато след 14-дневно приложение съединенията показват антиинфламаторен ефект във всички дози. Получените резултати могат да се обяснят с факта, че за ефективно блокиране на COX са необходими по-високи дози на изследваните съединения. Това говори за конкурентен

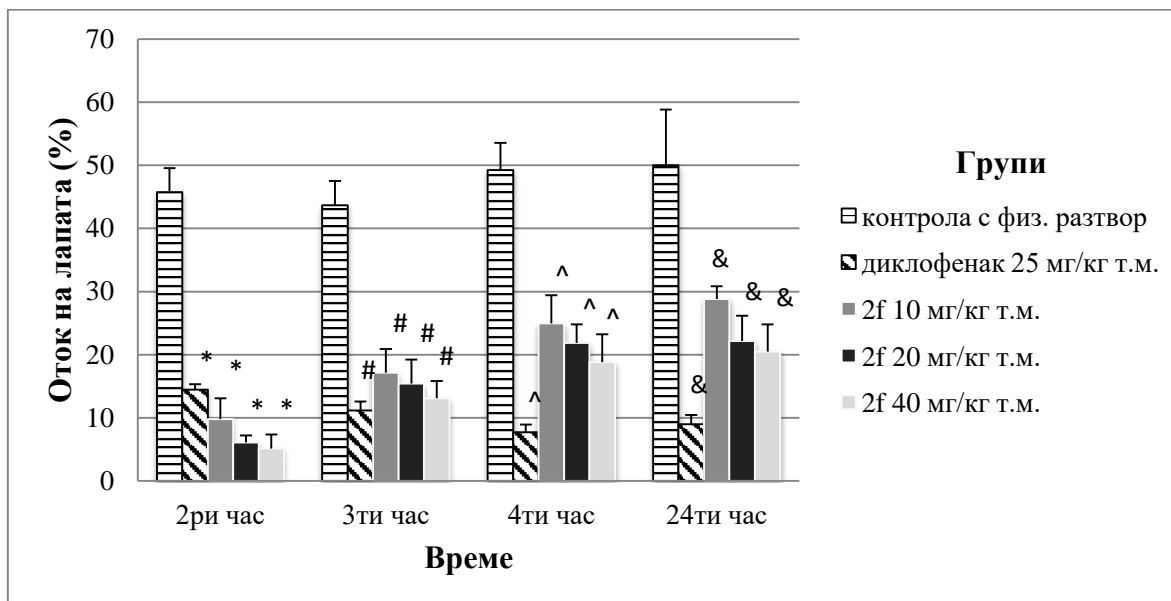
механизъм на инхибиране и за линейна кинетика и градирано/степенно отношение доза-отговор. Съединения 3d и 3f показват противовъзпалителен ефект само след 14-дневно приложение. Наблюдаваните при съединения 1c, 2e, 3e, 3d и 3f резултати могат да се обяснят с кумулативен ефект на съединенията, който осигурява стабилно свързване към СОХ. Тъй като регистрираните стойности на инхибиция на едема в по-високите дози на съединения 3e, 3d и 3f след 14-дневно приложение са приблизително еднакви, можем да направим извода, че след многократно прилагане и натрупване на съединенията се наблюдава нелинейна кинетика. При съединения 2f и 3g противовъзпалителен ефект се наблюдава след еднократно и многократно приложение като потискането на отока се регистрира и на 24-тия час. (Фиг. 19, 20.) Обяснение за добрият противовъзпалителен ефект на съединение 2f е конкретната структура на съединението. Съединение 2f съдържа фенилаланинов остатък и по първоначални данни от предварителната преценка за пространствената съвместимост между синтезираните молекули и ензима СОХ-2 и условията за реципрочно взаимодействие с активния център на мишената се намества лесно в хидрофобния джоб на СОХ-2.



Фиг. 19. Доза-ефект зависимост на противовъзпалителния ефект на съединение 2f в дози 10, 20 и 40 мг/кг т.м. при карагенинов модел на възпаление и еднократно приложение. * $p < 0.05$ сравнено с контрола на втори час; # $p < 0.05$ сравнено с контрола на трети час; ^ $p < 0.05$ сравнено с контрола на четвърти час; & $p < 0.05$ сравнено с контрола на 24-ти час.

Интерес представляват резултатите на съединение 3g, при което се регистрира противовъзпалителен ефект. Съединението съдържа остатък от триптофан в молекулата си и според компютърния модел не показва добра пространствена съвместимост с СОХ ензима, но въпреки това проявява изразена противовъзпалителна активност. Този резултат трябва да се

проучи детайлно, за да се обясни регистрирания ефект на съединението. При всички изследвани съединения инхибирането на отока на лапата се наблюдава по време на всички тествани часове, което говори, че съединенията повлияват както васкуларната, така и клетъчната фаза на експерименталното възпаление.



Фиг. 20. Доза-ефект зависимост на противовъзпалителния ефект на съединение 2f в дози 10, 20 и 40 мг/кг т.м. при карагенинов модел на възпаление и многократно приложение. * $p < 0.05$ сравнено с контрола на втори час; # $p < 0.05$ сравнено с контрола на трети час; ^ $p < 0.05$ сравнено с контрола на четвърти час; & $p < 0.05$ сравнено с контрола на 24-ти час.

VIII. ВЛИЯНИЕ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ ВЪРХУ НИВАТА НА СЕРУМНИТЕ ЦИТОКИНИ TNF- α , IL-10 И TGF- β 1 ПРИ ЕДНОКРАТНО И МНОГОКРАТНО ТРЕТИРАНЕ

Фармакологични проучвания в достъпната ни литература доказват промяна в нивата на цитокините при употребата на НСПВС (Beyer et al, 2012) (Abbasi et al, 2012), затова изследвахме нивата на серумните TNF- α , TGF- β 1 и IL-10 след еднократно и многократно приложение на съединения 1с, 2f, 3f и 3g в условията на системно възпаление, предизвикано от LPS. LPS стимулира имунната система, макрофагеалната активност и продукцията на инфламаторни цитокини. Взаимодействие на LPS с неговият рецептор TLR4 води до експресия на TNF α , IL-1 β , IL-6 и различни про-и противовъзпалителни цитокини, които оркестрират сложни имуновъзпалителни реакции (Vajja et al, 2004). Въпреки че инхибирането на синтеза на PG се счита за отговорно за противовъзпалителните свойства от НСПВС, е докладвано, че някои от тези лекарства също могат да намалят производството на провъзпалителни цитокини като TNF- α , IL-1 β и IL-6. Beekhuizen et al. установяват, че целекоксиб намалява продукцията на IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, NGF от

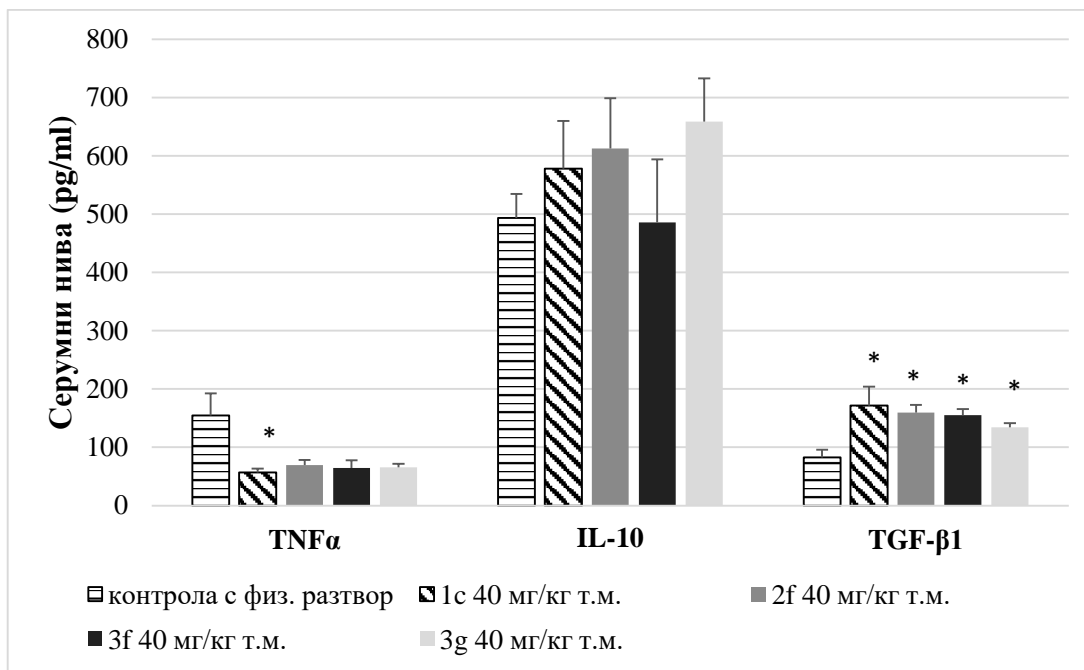
остеоартитен хрущял и синовиа (Beekhuizen et al, 2012). Възможен механизъм за този ефект е инхибиране на експресията на цитокиновите гени чрез инхибиране на транскрипционни фактори като NF-κB. Това предполага, че модулацията на производството на цитокини от НСПВС може да допринесе за тяхната противовъзпалителна активност (Jiang et al, 1998).

TNF-α индуцира експресията и секрецията на IL-6, IL-8 и други цитокини и предизвиква инфламаторна каскада и неконтролирано освобождаване на инфламаторни медиатори (Zhang et al, 2017). IL-10 е най-важният противовъзпалителен цитокин в човешкия имунен отговор (Asadullah et al, 2003). Той е мощен инхибитор на продуцираните от Th1 цитокини, включително IL-2 и IFN-γ. IL-10 играе роля и като деактиватор на моноцито/макрофагеалния синтез на проинфламаторни цитокини. TGF-β1 служи като биологичен регулатор, антагонизиращ или модифициращ действието на други цитокини или растежни фактори. TGF-β1 потиска пролиферацията и диференцията на T- и B-лимфоцитите и ограничава продукцията на IL-2, IFN-γ и TNF. TGF-β1 деактивира моноцитите и макрофагите подобно на IL-10. Тежката и неконтролирана възпалителна реакция, наблюдавана в TGF-β1 нокаут мишки, свидетелства за физиологичната роля на TGF-β1 като ендегенен антивъзпалителен цитокин (Cavaillon, 2001) (Nathan, 2002).

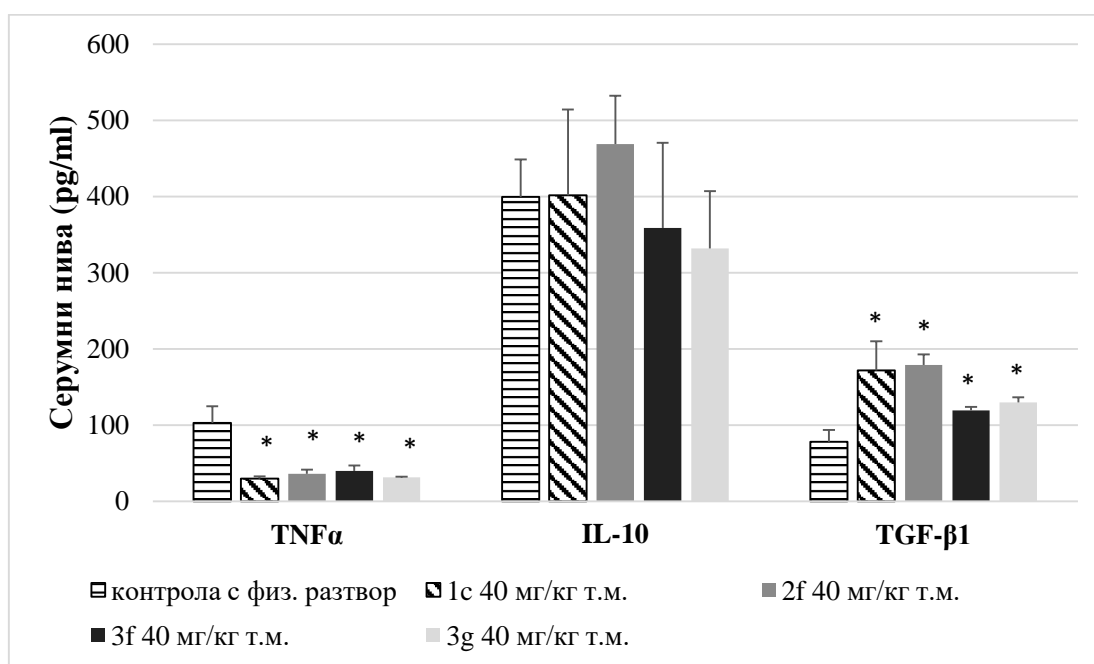
Azab et al. установяват, че нимезулид изцяло предотвратява LPS-индуцираното повишение на серумният TNF-α у плъхове (Azab et al, 1998). Подобни резултати наблюдават Dogan et al., според които нимезулид частично предотвратява повишението на серумните нива на TNF-α (Dogan et al, 2002). Тези автори докладват, че диклофенак също намалява повишените TNF-α нива, но само в най-високата използвана доза. Установено е, че аспирин проявява потискащ ефект върху продукцията на TNF-α, стимулирана от LPS приложение. Наблюдават се множество противоречиви резултати. Етодолак, напроксен и тенидап намаляват повишените нива на TNF-α след LPS приложение у мишки. Индометацин и ибупрофен повишават TNF-α нивата при системно възпаление у плъхове и мишки. Ибупрофен увеличава нивата на TNF-α и у здрави доброволци, инжектирани с LPS, докато аспирин е неефективен при същите условия. Тези несъответствия могат да се дължат на разликата в използваните животински видове и моделите, използвани за предизвикване на системно възпаление (Dogan et al, 2002). В експериментално проучване на Azab et al., при което плъхове получават LPS субплантарно, нимезулид приложен един час преди липополизахарида намалява нивата на TNF-α в ексудат от лапата значително спрямо контролната група. Индометацин не потиска увеличението на TNF-α в ексудата. В предишни *in vitro* и *in vivo* проучвания на същите автори, индометацин води до увеличение в

продукцията на TNF- α . PGE₂ участва в регулацията на синтеза на TNF- α на принципа на отрицателната обратна връзка и това може да обясни свръхпроизводството на TNF- α , индуцирано от индометацин (мощен супресор на продукцията на PGE₂) (Azab et al, 2001). Beyer et al. докладват, че в клинично проучване проведено от Rosenstein et al. едноседмична употреба на пироксикам у здрави доброволци води до намаление в продукцията на IL-1, IL-6, TNF- α и IFN γ . Интравенозното приложение на лорноксикам при септични пациенти не повлиява нивата на тези цитокини. Изглежда, че НСПВС проявяват имуномодулаторни ефекти, независими от блокирането на COX като например инхибиция на NF- κ B (Beyer et al, 2012). В проучване на Vajja et al. рофекоксиб не инхибира LPS-индуцираното повишение в серумните нива на TNF- α . Същата доза рофекоксиб обаче потиска карагенин-индуцирания оток. Приложението на целекоксиб в ниски дози намалява увеличените нива на TNF- α и редуцира отока на лапата, но в по-високи дози (200 мг/кг т.м.) стимулира експресията на TNF- α . Авторите предполагат, че това се дължи на двойните ефекти върху активността на NF- κ B, които целекоксиб показва. NF- κ B е важен транскрипционен фактор, с роля в TNF- α експресията и LPS-индуцираните имунни реакции (Vajja et al, 2004). Kaygusuz et al. проследяват ефекта на напроксен върху серумните нива на TGF- β 1 у плъхове с модел на тибиялна фрактура. Установено е намаление в нивата на TGF- β 1 след едноседмично третиране с напроксен, като подобни резултати се наблюдават след дву- и четириседмично отчитане. Това намаление на TGF- β 1 е свързано със забавен процес на зарастване на фрактурата (Kaygusuz et al, 2006). El-Gowell et al. регистрират високи нива на IL-2 and TGF- β 1 в бъбречна тъкан на плъхове, третирани с циклоспорин. След ко-администрация на целекоксиб нивата на тези цитокини се възстановяват до норма. Едновременното приложение на целекоксиб практически премахва проявите на нефротоксичност от циклоспорина (които включват функционални, възпалителни, фибротични и структурни промени) (El-Gowell et al, 2014). У плъхове с модел на карцином на пикочния мехур, третирани с целекоксиб Parada et al. не наблюдават промяна в нивата на TGF- β 1, но регистрират увеличение в нивата на TNF- α и намаление в стойностите на CRP (Parada et al, 2009). Ni et al. установяват, че приложението на рофекоксиб или лумиракоксиб не повлиява антиген-презентиращите клетки и тяхната способност да продуцират IL-10 в клетъчни култури (Ni et al, 2007).

Съединение 1c намалява нивата на TNF- α след еднократно и многократно приложение, докато съединения 2f, 3f и 3g сигнификантно намаляват серумните нива на TNF- α след 14-дневно приложение. Нито едно от изследваните съединения не повлиява нивата на IL-10. Съединения 1c, 2f, 3f и 3g увеличават серумните нива на противовъзпалителния цитокин TGF- β 1 след еднократно и 14-дневно приложение. (*Фиг. 21, 22.*)



Фиг. 21. Промени в серумните нива на *TNF-α*, *IL-10* и *TGF-β1* при липополизахарид индуциран модел на възпаление и еднократно третиране със съединения 1c, 2f, 3f и 3g. * $p < 0.05$ при сравнение с контрола.



Фиг. 22. Промени в серумните нива на *TNF-α*, *IL-10* и *TGF-β1* при липополизахарид индуциран модел на възпаление и многократно третиране със съединения 1c, 2f, 3f и 3g. * $p < 0.05$ при сравнение с контрола.

Промените в нивата на *TNF-α* в серума потвърждават наличието на противовъзпалителен ефект. Съединения 2f и 3g показват достоверно потискане на карагенин-предизвикания оток след еднократно приложение, докато промените в нивата на *TNF-α* се наблюдават след 14-дневно приложение. Острото възпаление, предизвикано с интраплантарното

въвеждане на карагенин е локално, докато нивата на серумни цитокини отразяват системни промени, което може да обясни необходимостта от по-дълго приложение, за да се прояви системен ефект. Промените в нивата на TGF- β 1 говорят за имуномодулаторен ефект на съединенията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резултатите от нашето проучване могат да бъдат обобщени в няколко раздела: чувствителност на тестовете за изследване на аналгетична активност и противовъзпалителна активност, нива на осъществяване и механизми на аналгетичен и противовъзпалителен ефект, различия в структурата на пироловите съединения, с които са свързани проявени ефекти и регистрирани промени в биохимични и хематологични показатели, както и хистологични промени в изследвани органи.

При изследване на съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f и 3g за установяване на остра токсичност всички животни от експерименталните групи преживяха 24-часовия период след приложение на тестваните субстанции и не показаха отклонения в поведението. Това позволява да заключим, че изследваните съединения са ниско токсични след еднократно приложение в дози до 1000 мг/кг т.м.

В експериментални проучвания е установено, че някои от представителите на НСПВС водят до намалени стойности на кръвната захар. Всички седем съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f и 3g доведоха до намаляване нивата на глюкоза. Това трябва да се има в предвид при комбинирането им с други субстанции, тъй като могат да се наблюдават потенциални лекарствени взаимодействия. В достъпната ни литература съществуват противоречиви данни по отношение влиянието на НСПВС върху нивата на чернодробните ензими. Нито едно от изследваните от нас съединения не доведе до увеличение в нивата на АсАТ и АлАТ. Характерна НЛР, свързана с употребата на НСПВС е бъбречно увреждане, което обикновено е обратимо. Три от съединенията повишиха нивата на креатинин и техният нефротоксичен потенциал беше потвърден хистологично.

По литературни данни някои НСПВС водят до намаление в общия брой левкоцити. Всички съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f и 3g водят до намаление в стойностите на левкоцитите. Характерно отклонение в хематологичните показатели при употребата на неселективни НСПВС е тромбоцитопенията. Тромбоцитите са чувствителни към блокиране на СОХ-1, тъй като не могат да ресинтезират ензима. При две от изследваните съединения се наблюдава тромбоцитопения. Възможно е да се касае за липса на селективност. Други две от съединенията в най-високите тествани дози намаляват нивата на хемоглобин.

Всички от изследваните съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f и 3g показват запазена сърдечна морфология. Установяват се дилатирани кръвоносни съдове от малък калибър. По литературни данни, киселинни НСПВС с кратък полуживот и период на дозиране над 8 ч. водят до възстановяване на вазодилатативни простагландини. Всички от тестваните от нас съединения са производни на N-пиролилкарбоксилната киселина, а периодът им на дозиране е 24 часа. Това ни дава основание да заключим, че наблюдаваната вазодилатация се дължи на особености във фармакокинетиката им. Пет от съединенията показват промени в морфологията на стомашната лигавица, изразяващи се основно в хиперплазия и хипертрофия на париетални клетки. Не се наблюдават типичните за употребата на НСПВС ерозии и улцерации. При пет от съединенията се наблюдават фокални изменения в бъбречния паренхим под формата на дилатирани дистални каналчета, променена морфология на мезангиалните клетки и дилатирани кръвоносни съдове. Характерно за нефротоксичността, предизвикана от НСПВС е, че тя обикновено е обратима след прекратяване на приема. При три от съединенията потенциалът за нефротоксичност е потвърден от увеличените нива на креатинин, до които те водят.

В настоящото проучване на седем новосинтезирани съединения установихме, че всички тествани съединения проявяват аналгетичен и противовъзпалителен ефект.

Седемте съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f и 3g показват аналгетично действие срещу термични и химични стимули като този ефект се регистрира след еднократно и многократно (14-дневно) приложение. Въз основа на използваните ноцицептивни модели при шест от съединенията установяваме участие на супраспинални механизми в оказваната антиноцицепция. В индуцираната аналгезия на пет от съединенията има участие на спинални пътища. Това заключение е направено въз основа получените резултати от тест тейл флик. В нашето изследване при три от съединенията се наблюдава развитие на толерантност към аналгетичния ефект на спинално ниво. По литературни данни от различни автори е установена толерантност към други НСПВС, подобна на толерантността към опиоиди. Наблюдава се отслабване на антиноцицептивния ефект на НСПВС след приложение на налоксон (опиоиден рецепторен антагонист). Тези данни ни дават основание да заключим, че е възможна намеса на опиоидергичната медиация в оказваната от тези съединения антиноцицепция. При изследване на аналгетичния ефект на съединенията не установихме дозозависимост и времезависимост. В механизма на аналгетичния ефект на изследваните съединения освен инхибиция на COX може да се допусне участие на допълнителни механизми на супраспинално и спинално ниво.

При нашето проучване на новосинтезирани пиролови съединения за аналгетичен ефект с най-голяма чувствителност е плантарният тест. Препоръчваме при скринингово изследване на аналгетична активност на съединения с подобна структура използването на този тест.

Всички тествани съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f и 3g показват противовъзпалителен ефект при експериментален карагенинов оток на плъхове. След еднократно приложение в ефекта на съединенията се наблюдава дозозависимост и времезависимост. Това говори за конкурентно инхибиране на циклооксигеназата и линейна кинетика на изследваните съединения. След многократно приложение съединенията потискат отока на лапата и в ниските дози, което говори за функционална кумулация и нелинейна кинетика.

В достъпната ни литература съществуват противоречиви данни за ефекта на НСПВС върху нивата на провъзпалителния цитокин TNF- α и противовъзпалителния цитокин TGF- β 1. Подбрани бяха четири съединения, показали висока противовъзпалителна активност на карагениновия модел на възпаление. Съединения 1c, 2f, 3f и 3g достоверно намалиха нивата на серумния TNF- α и увеличиха нивата на серумния TGF- β 1. Изследването на промените на серумните нива на провъзпалителния цитокин TNF- α и противовъзпалителния цитокин TGF- β 1 позволява обективно да потвърдим наличието на противовъзпалителен ефект на изследваните съединения. Вероятно редуцията в стойностите на TNF- α се дължи на механизми, различни от инхибиция на COX като например инхибиране активността на транскрипционен фактор NF- κ B. Повишаването на нивата на TGF- β 1 говори, че освен противовъзпалителен се регистрира и имуномодулаторен ефект на съединенията.

Въз основа на получените резултати от изследванията за аналгетичен и противовъзпалителен ефект, както и за остра и хронична токсичност ние избрахме един представител от новосинтезираните съединения, върху който в бъдеще да се проведат по-задълбочени фармакодинамични и фармакокинетични проучвания. Съединение 1c показва най-ниска органна токсичност, без промени в морфологията на стомашна лигавица и бъбречен паренхим, без увеличение в нивата на креатинин и чернодробни ензими и без промени в броя еритроцити и тромбоцити. Съединението демонстрира достоверна аналгетична и противовъзпалителна активност след еднократно и многократно приложение. Съединение 1c е добър потенциален кандидат за разширено и насочено предклинично проучване.

ИЗВОДИ

1. Седемте съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f и 3g в експериментални условия показват аналгетична активност срещу термични и химични стимули след еднократно и многократно приложение.

2. Съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f и 3g показват противовъзпалителен ефект в експериментални условия. Съединения 3d, 3e, 3f показват противовъзпалителен ефект само след 14-дневно приложение. Всички тествани съединения повлияват васкуларната и клетъчната фаза на експерименталното възпаление.

3. При липополизахарид-индуцирания модел на възпаление изследваните съединения 1c, 2f, 3f и 3g показват противовъзпалителен ефект след многократно приложение, проявен с намаление в серумните нива на проинфламаторния цитокин TNF- α . Тестваните съединения показват имуномодулаторен ефект след еднократно и многократно третиране, изразен с промяна в нивата на противовъзпалителния цитокин TGF- β 1.

4. С най-ниска органна токсичност са съединения 1c и 2e. Промени в морфологията на стомашната лигавица се регистрират при съединения 2f, 3d, 3e, 3f и 3g. Съединения 2f, 3f и 3g имат нефротоксичен потенциал.

5. В експериментални условия при всички тествани съединения е необходимо продължително третиране за адекватно блокиране на COX и проява на противовъзпалителен ефект.

6. При съединения 3d, 3f и 3g след 14-дневно приложение се наблюдава толерантност към аналгетичния ефект на спинално ниво и възможно участие на опиоидергичната медиация в осъществяваната антиноцицепция.

7. Подходящи методи за регистриране на антиноцицепция след еднократно и многократно третиране при съединения с подобна пиролова структура са плантарен тест, тейл флик и формалинов тест. Подходящи цитокини за регистриране на противовъзпалителен и имуномодулаторен ефект на подобни пиролови съединения са TNF- α и TGF- β 1.

ПРИНОСИ

I. Приноси с научно-теоретично значение

1. За първи път е установено наличието на аналгетичен и противовъзпалителен ефект на новосинтезираните съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f и 3g в експериментални условия върху мъжки плъхове порода *Wistar*.

2. Установени са хистологични промени в препарати от сърце, стомах и бъбреци на мъжки плъхове порода *Wistar*, третирани 14 дни с новосинтезираните съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f и 3g.

3. Проследени са промените в клинично-лабораторни и хематологични показатели на мъжки плъхове порода *Wistar*, третирани многократно със съединения 1c, 2e, 2f, 3d, 3e, 3f и 3g.

4. За първи път е регистрирана промяна в серумните нива на провъзпалителния цитокин TNF- α и противовъзпалителния цитокин TGF- β 1 при липополизахарид-индуциран модел на възпаление при третиране на мъжки плъхове порода *Wistar* с новосинтезираните съединения 1c, 2f, 3f и 3g в условията на еднократно и многократно приложение.

II. Приноси с научно-приложно значение

1. От седемте изследвани новосинтезирани пиролови съединения е избрано пироловото съединение 1c за по-задълбочени и насочени предклинични проучвания. Съединението е с най-добри показатели по отношение на остра и субхронична токсичност, аналгетично и противовъзпалително действие.

2. Предложен е най-подходящ панел от тестове за скринингово изследване на аналгетична и противовъзпалителна активност на съединения с подобна пиролова структура.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Пълнотекстови публикации

1. **Zlatanova H**, Vladimirova S, Kostadinov I, Delev D, Kostadinova I. Experimental evaluation of the analgesic activity of 2-(3-diethylcarbamoyl-2-methyl-5-phenyl-pyrrol-1-yl)-3-phenyl-propionic acid. *Int J Pharm Clin Res* 2016; 8 (11):1483-8.
2. **Zlatanova H**, Vladimirova S, Kostadinov I, Delev D, Deneva T, Kostadinova I, Bijev A. Novel N-pyrrolylcarboxylic acid derivative as a potential new analgesic and anti-inflammatory drug. *Int J Pain Manag* 2017; 1-12.
3. **Златанова Х**, Кандиларов И, Костадинов И, Костадинова И. Експериментално проучване на аналгетична активност на ново синтезиран структурен аналог на Celecoxib. *Сборник статии от юбилейни научни конференции по фармакология и клинична фармакология за млади учени* 2017; 129-32.
4. **Zlatanova H**, Vladimirova S, Kostadinov I, Bijev A. In vivo evaluation of the anti-inflammatory activity of 2-[3-Acetyl-5-(4-chloro-phenyl)-2-methyl-pyrrol-1-yl]-4-methylsulfanyl-butyric acid. *Folia Medica* 2017. Под печат.

Разширени резюмета

1. **Zlatanova H**, Vladimirova S, Kandilarov I, Kostadinov I, Delev D, Kostadinova I. Analgesic and anti-inflammatory effects of a novel N-pyrrolylcarboxylic acid derivative. *Eur Neuropsychopharmacol* 2017; 27 (Suppl. 4):S670-1. **IF=4.239**

Участия в научни форуми

1. **Златанова Х**, Кандиларов И, Костадинов И, Костадинова И. Експериментално проучване на аналгетична активност на ново синтезиран структурен аналог на Celecoxib. Научна конференция „Дръзновение и младост във фармакологията“, 7-9 Октомври 2016.
2. **Zlatanova H**, Vladimirova S, Kandilarov I, Kostadinov I, Delev D, Kostadinova I. Analgesic and anti-inflammatory effects of a novel N-pyrrolylcarboxylic acid derivative. *ECNP Paris, France* 02-05 September 2017.
3. **Златанова Х**, Владимирова С, Кандиларов И, Костадинова И, Бижев А. Експериментално проучване на противовъзпалителна активност на 2-заместена-3-фенилпропионова киселина.

Научна сесия на СУБ-Пловдив „Дни на науката 2017“, 2-3 ноември 2017.

Проекти

1. Вътреуниверситетски проект на МУ-Пловдив **НО-7/2015** на тема „Експериментално фармакологично проучване на противовъзпалителна активност на ново синтезирани пиролови съединения“.

Искам да изразя своята сърдечна благодарност към:

- ❖ Научния ми ръководител проф. д-р Иванка Костадинова, дм за оказаните ми безрезервна подкрепа и доверие, за безценните съвети и напътствия, за помощта в написването на този дисертационен труд. Благодаря ѝ за това, че бе най-отзивчивият и страхотен ръководител.
- ❖ Доц. д-р Илия Костадинов, дм и доц. д-р Делян Делев, дм за съдействието им във всяко едно отношение – експериментално, административно и морално.
- ❖ Маг. фарм. Илин Кандиларов, който беше почти неотлъчно до мен в лабораторията.
- ❖ Гл. ас. Станислава Владимирова, дх за дизайна и синтеза на изследваните съединения, без които този труд нямаше как да бъде осъществен.
- ❖ Д-р Дарина Барбутска, дм, Валя Тричкова, доц. д-р Таня Денева, дм и д-р Петя Гарджева за извършването на част от експериментите в настоящия дисертационен труд.
- ❖ Йонка Коликова, Венета Желязкова, Славка Стефанова и Теди Томова за прецизната работа и помощта при провеждане на експериментите.
- ❖ Колегите от катедрата по Фармакология и клинична фармакология и катедрата по Фармакология и лекарствена токсикология за благоприятната работна атмосфера.
- ❖ Академичното ръководство на МУ-Пловдив за институционалната подкрепа.
- ❖ Моите семейство и приятели за безкрайното търпение, разбиране и морална подкрепа.