

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ  
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ  
НАПРАВЛЕНИЕ ПОВЕДЕНЧЕСКА НЕВРОБИОЛОГИЯ

**In vitro ефекти на опиоидни аналгетици върху вискозо-  
еластичните характеристики на аортна стена от плъх при  
старееие и мелатонинов дефицит**

Проект за автореферат

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

маг. фарм. Анджан Георгиев

Научна специалност:

Фармакология

Научен ръководител:

Доц. Мария Антонова

Научен консултант:

Проф. Росица Замфирова

София, 2026 г.

Дисертационният труд е написан на 176 страници и съдържа 63 фигури, 23 таблици и 8 математически формули. Използвани са 341 литературни източника. Всички експериментални данни, включени в дисертационния труд, са получени в Институт по невробиология – БАН.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на разширен научен семинар на Направление „Поведенческа невробиология“ – ИНБ-БАН, проведен на 26.02.2026 г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... 2026 г. от ..... ч. в залата на Институт по невробиология, ул. "Академик Г. Бончев", бл. 23, ет. 2, на открито заседание на научното жури, утвърдено от НС със Заповед на Директора на ИНБ-БАН № .....

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Институт по невробиология на БАН, бл. 23, ет. 2.

## Съдържание

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.    | Въведение.....   | 6  |
| 2.    | Цел и задачи.....  | 7  |
| 2.1   | Цел .....  | 7  |
| 2.2   | Задачи .....   | 7  |
| 3.    | Материали и методи.....  | 8  |
| 3.1   | Материали .....  | 8  |
| 3.1.1 | Експериментални животни и препарати .....                      | 8  |
| 3.1.2 | Вещества .....   | 9  |
| 3.2   | Метод за изследване на вискозоеластични характеристики.....    | 9  |
| 3.3   | Метод за изследване на съкратителна активност.....             | 13 |
| 3.4   | Методи за статистически анализ на получените данни .....       | 14 |
| 3.4.1 | Дескриптивни методи .....                                      | 14 |
| 3.4.2 | Сравнителни методи .....                                       | 14 |
| 3.5   | Ограничения на използваните методи .....                       | 15 |
| 4.    | Резултати.....   | 15 |
| 4.1   | Без опиоидни аналгетици .....                                  | 15 |
| 4.1.1 | Влияние на възрастта .....                                     | 17 |
| 4.1.2 | Влияние на мелатониновия дефицит.....                          | 20 |
| 4.2   | Фентанил .....   | 22 |
| 4.2.1 | Ефекти на фентанил в sham групата.....                         | 22 |
| 4.2.2 | Ефекти на фентанил в рip групата .....                         | 26 |
| 4.2.3 | Влияние на мелатониновия дефицит върху ефектите на фентанил..  | 30 |
| 4.2.4 | Влияние на възрастта върху ефектите на фентанил .....          | 32 |
| 4.3   | Трамадол .....   | 34 |
| 4.3.1 | Ефекти на трамадол в sham групата .....                        | 34 |
| 4.3.2 | Ефекти на трамадол в рip групата .....                         | 37 |
| 4.3.3 | Влияние на мелатониновия дефицит върху ефектите на трамадол .. | 40 |
| 4.3.4 | Влияние на възрастта върху ефектите на трамадол.....           | 42 |
| 5.    | Дискусия.....  | 43 |
| 5.1   | Влияние на възрастта .....                                     | 43 |
| 5.2   | Влияние на мелатониновия дефицит.....                          | 44 |
| 5.3   | Фентанил .....   | 47 |
| 5.4   | Трамадол .....   | 52 |
| 6.    | Заклучение .....   | 55 |

|    |   |           |
|----|---|-----------|
| 7. | Изводи .....  | 55        |
| 8. | Приноси.....  | 56        |
|    | <b>Списък с публикации.....</b>                                   | <b>57</b> |
|    | <b>Списък с участия на национални и международни форуми .....</b> | <b>57</b> |
|    | <b>Списък с участия в проекти .....</b>                           | <b>57</b> |
|    | <b>Abstract.....</b>  | <b>58</b> |

## Съкращения

|           |   |
|-----------|---|
| ГАМК      | гама-аминомаслена киселина  |
| ГМК       | гладкомускулни клетки   |
| НАЛ       | налоксон  |
| ОА        | опиоиден аналгетик  |
| ССС       | сърдечно-съдова система   |
| ХР        | хранителен разтвор  |
| ЦНС       | централна нервна система  |
| ANCOVA    | анализ на ковариацията  |
| EFS       | посока на промяна на честота на смущаващите трептения                 |
| GC        | гуанилат циклаза  |
| HPA       | хипоталамо-хипофизо-адренална ос                                      |
| $K_{ATP}$ | АТФ-зависими калиеви канали   |
| KCl       | калиев хлорид   |
| $K_i$     | дисоциационна константа на инхибитора                                 |
| LFES      | нискочестотна електрическа стимулация                                 |
| M         | моларна маса; mol/L   |
| NO        | азотен оксид  |
| pH        | отрицателен десетичен логаритъм от концентрацията на водородните йони |
| PVAT      | периваскуларна мастна тъкан   |
| PVN       | паравентрикуларното ядро  |
| ROS       | реактивни кислородни радикали   |
| SCN       | супрахиазматично ядро   |
| SEM       | стандартна грешка на средноаритметичната стойност                     |
| VP        | вазопресин  |

## 1. Въведение

Биомеханичното поведение на артериите описва взаимодействието между механичните свойства на съдовата стена и хемодинамичното натоварване, определящо деформационния отговор. Този интердисциплинарен подход разширява възможностите за анализ и предвиждане на ефекта на отделни стимули и състояния върху артериалната стена. Един от показателите за проследяване на изменения в деформационния отговор на артериите е съдовата вискозоеластичност. Изследването на този показател, при изключено влияние на нервната и хуморална регулация от организма, се провежда в *in vitro* експерименти, оценяващи непосредственото въздействие на използваните субстанции върху препарати от артериална тъкан. Множество изследвания разглеждат биомеханичното поведение на артериите под въздействието на някои вътрешни и външни фактори. Един от тези фактори е влиянието на лекарствени вещества, прилагани директно в системното кръвообращение. Познаването на ефектите върху сърдечно-съдовата система на лекарствени вещества от групата на опиоидните аналгетици, представлява интерес за клиничната практика поради възможността за подобряване на тяхната терапевтичната ефикасност и безопасност. Опиоидни аналгетици като фентанил и трамадол намират приложение в медицинската практика за потискане на силна остра или хронична болка, както и при балансираната обща анестезия, използвана при хирургични интервенции. Тяхната употреба налага задълбочено познаване на действието на конкретния аналгетик върху кръвоносната система, вземайки предвид възможните промени в биомеханичния отговор на артериите, наличието на подлежаща патология и коморбидни състояния.

В някои изследвания фентанил е показал непряко влияние върху тонауса на васкуларната мускулатура по два самостоятелни механизма на действие, различни от активирането на опиоидни рецептори: потискане на вазодилатиращото действие на стимулирания от ацетилхолин ендотелен слой чрез инхибиране на вьтреклетъчния сигнален път на активираните М<sub>3</sub>-холинорецептори; потискане на вазоконстриктивното действие на фенилефрин, при което фентанил се конкурира с него за свързване с  $\alpha_1$ -адренорецепторите по повърхността на гладкомускулните клетки в отсъствие на ендотелен слой. По отношение на трамадол, влиянието на неговите енантиомери върху съкращението на артериалната мускулатура в препарати от торакална аорта на Wistar плъхове, предварително съкратени с фенилефрин показват, че R(+)-трамадол, но не и S(-)-трамадол предизвиква ендотел-зависима вазорелаксация. R(+)-трамадол влияе както на  $\mu$  опиоидни рецептори в ендотела, така и на такива в медиата, макар и в по-малка степен. S(-)-трамадол от своя страна инхибира обратното захващане на норадреналин. Установено е, че аналгетичния ефект на трамадол в ЦНС се дължи на синергията между различните механизми на действие на двата енантиомера

Сред другите фактори, които оказват въздействие върху биомеханичното поведение на артериите, е свързаното с възрастта ремоделиране на артериалната стена. Този процес се случва в по-кратки или по-дълги интервали от време и в зависимост от това може да бъде обратим или необратим. Промяната в биомеханичните свойства на аортната стена значително повишава риска от развитие на сърдечно-съдови заболявания като хипертония, аортна аневризма, аортна дисекация и други. Поради това, че биомеханичното напрежение в артериалното дърво е най-голямо в неговото начало, стареенето на аортата е най-бързо в сравнение с другите големи кръвоносни съдове. Характерно за този процес е нарастването на диаметъра и твърдостта (англ. stiffness) на артерията, както и загубата на разтегливост под въздействие на вьтрелуменното налягане.

Редица хормони, сред които и мелатонин, представляват друг фактор за биомеханичното поведение на артериите. Известно е, че с напредването на възрастта секретирания от пинеалната жлеза (епифиза) мелатонин при повечето бозайници (в т.ч. и човека) намалява. Въпреки това, освен с възрастта, спад в плазмената концентрация на пинеалния хормон се открива също и при по-млади индивиди с някои неврологични, невродегенеративни, онкологични, метаболитни и редки вродени заболявания. Хроничната експозиция към изкуствена светлина през нощта също потиска секрецията на мелатонин. Предвид всичко това може да бъде прието, че дисфункцията на епифизата и свързания с нея мелатонинов дефицит не са рядкострещано явление. Ендокринните, неврорегулаторни, имуносупресивни, антиоксидантни и противовъзпалителни ефекти на мелатонина са добре описани в литературата, като немалко изследвания демонстрират същественото влияние на пинеалния хормон върху хомеостазата на артериалната стена, но въпреки това неговите преки и непреки ефекти върху биомеханичните ѝ свойства остават недостатъчно проучени. Това налага необходимостта от провеждане на допълнителни изследвания за влиянието на мелатониновия дефицит върху вискозоеластичността на артериалната стена във връзка с възможни сърдечно-съдови усложнения след прилагането на опиоидни аналгетици преди, по време на или след хирургични процедури.

Резултатите от това изследване, биха могли да допринесат за подобряване на терапевтичния избор на опиоидни аналгетици и тяхното дозиране с цел намаляване на нежеланите ефекти върху сърдечно-съдовата система, при физиологично ниво на секретирания от епифизата мелатонин, в условия на мелатонинов дефицит, както и в зависимост от възрастта на пациентите.

## 2. Цел и задачи

### 2.1 Цел

Целта на настоящия труд е изследване на непосредственото въздействие (*in vitro*) на опиоидните аналгетици фентанил и трамадол върху вискозоеластичните характеристики на аортна стена от плъх, при различни възрасти, в норма и мелатонинов дефицит, както и при премахнати нервна и хуморална регулация от страна на организма.

### 2.2 Задачи

За изпълнение на поставената цел бяха определени следните задачи:

1. Влияние на възрастта – да се сравнят вискозоеластичните характеристики на аортни препарати от здрави (sham-оперирани) Wistar плъхове, на различни възрасти, в зависимост от еквивалентното кръвно налягане, както без вещества, така и в присъствие на фентанил или трамадол.
2. Влияние на мелатониновия дефицит – да се сравнят вискозоеластичните характеристики на аортни препарати от здрави, sham-оперирани (sham група) и пинеалектомирани (pin група) Wistar плъхове в зависимост от еквивалентното кръвно налягане, при различни възрасти на експерименталните животни, както без вещества, така и в присъствие на фентанил или трамадол.

3. Влияние на опиоидни аналгетици – да бъде изследвана зависимостта концентрация-ефект спрямо вискозоеластичните характеристики на аортни препарати, както от sham-оперирани, така и от пинеалектомирани Wistar плъхове, при няколко нива на еквивалентното кръвно налягане след прилагане на:
  - a. фентанил или трамадол, в нарастващи концентрации;
  - b. налоксон, в комбинация с нарастващи концентрации фентанил или трамадол.

### 3. Материали и методи

#### 3.1 Материали

##### 3.1.1 Експериментални животни и препарати

За експериментите бяха използвани здрави, мъжки Wistar плъхове, доставени от Експерименталната развъдна база за опитни животни към Институт по невробиология на Българска академия на науките. Работата с експерименталните животни е одобрена от Българската агенция по безопасност на храните с разрешение № 300/N°5888–0183/10.05.2021. Всички дейности са извършени в съответствие с Декларацията от Хелзинки и Директива 2010/63/ЕС.

Изборът на експериментални животни се основава на няколко критерия, сред които съпоставимост с експерименталните условия в други научни изследвания, както и възможността да се приложат за сравнително кратко време различни модели на патологични състояния. Бяха избрани плъхове поради сравнително големия размер на аортата – 1,2 – 2,5 мм, което я прави по-лесна за изследване като лентов препарат. Биомеханичните качества и физиологичните отговори при аорта от плъх са близо до човешките, с предимството, че аортата от плъх може да бъде отпрепарирана и изследвана непосредствено след смъртта на животното, при запазена виталност. Продължителността им на живот до 2 години, улеснява изследванията при стареене.

Експерименталните плъхове бяха разпределени в три възрастови групи – 3-месечни (млади, полово зрели), 14-месечни (възрастни) индивиди и 18-месечни (стари) плъхове. Всяка възрастова група плъхове беше допълнително разделна на две групи, според типа на проведената хирургична операция: шам-оперирани (sham група) и пинеалектомирани плъхове (pin група). Пинеалектомията в pin групата беше извършена съгласно протокола на Hoffmann и Reiter, използван също в изследване на Tchekalarova et al.

Без значение на пинеалния статус (шам-оперирани или пинеалектомирани), всички експериментални животни бяха отгледани допълнително за период от 14 дни след проведената операция, така че да се осигури достатъчно време за проявата на хроничен ефект от липсата на физиологична мелатонинова секреция, а оттам и патологично въздействие върху кръвоносната система и в частност артериалната стена.

За получаване на аортните препарати всяко от експерименталните животни се умъртвява чрез декапитиране и последващо обезкървяване. В рамките на 10 минути след смъртта се извършват лапаро- и торакотомия, по време на които се отпрепарира сегмент от аортата, в частта ѝ от края на аортната дъга до началото на реналните артерии.

Отпрепарираният сегмент от аортата се поставя в неаериран и охладен до 4°C хранителен разтвор, така че да се забавят процесите на тъканна некроза след смъртта. Използваният хранителен разтвор представлява модификация на разтвора на Tyrode, имащ рН 7,2 – 7,4, който се използва по време на всички опити – както самостоятелно, така и с разтворени в него едно или повече фармакологично активни вещества. Аортата се почиства от периваскуларна мастна тъкан и прилежащата ѝ *tunica adventitia*, а също ендотелният слой на *tunica intima* се отстранява, без да се нарани подлежащата тъкан. Останалата медия се изрязва под ъгъл 60° спрямо оста ѝ, до ивица с ширина 3 mm и дължина между 40 и 50 mm, която се разделя на два препарата (по около 20-25 mm) – торакален и абдоминален. В предишни изследвания е доказано, че експерименталният протокол запазва жизнеността на получените препарати за време не по-малко 4 часа, позволявайки изследване на тяхното биомеханично поведение в квази-физиологични условия.

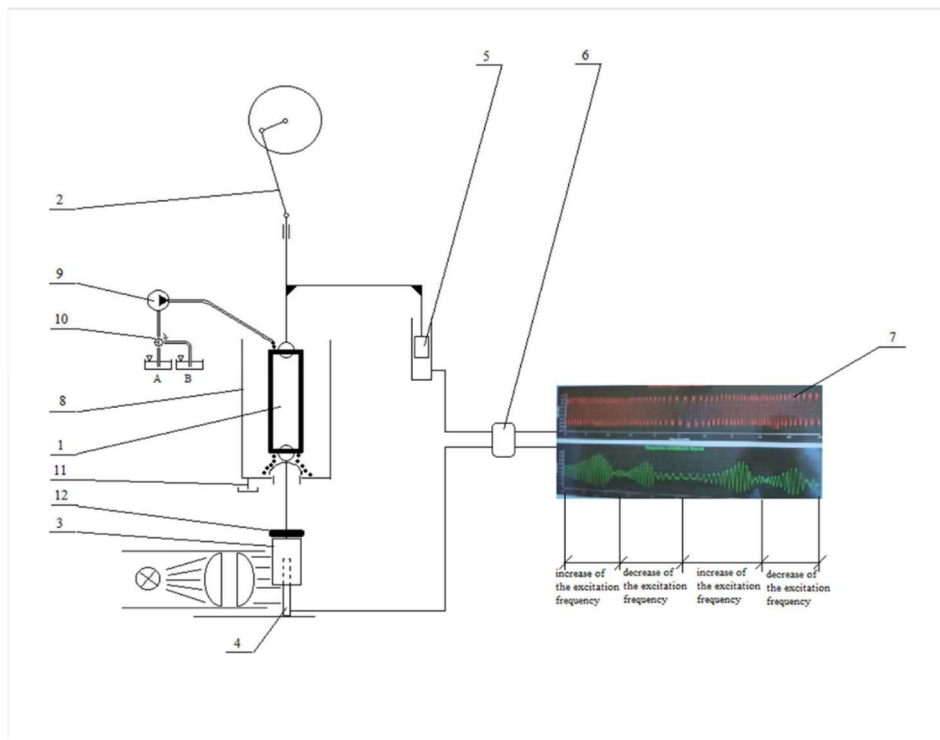
### **3.1.2 Вещества**

Употребата на опиоидни аналгетици за научни изследвания, съгласно чл. 73, ал. 1 от Закона за контрол на наркотичните вещества и прекурсорите е одобрена с Разрешение № 5 / 19.04.2021 г. от Министерство на здравеопазването на Република България.

При провеждане на експериментите е използван инжекционен разтвор на фентанил цитрат, 50 µg/ml, ампули (Gedeon Richter, Унгария), инжекционен разтвор на трамадол хидрохлорид, 50 mg/ml, ампули (Sopharma, България) и инжекционен разтвор на налоксон хидрохлорид, 0,4 mg/ml, ампули (Warsaw Pharmaceutical Works Polfa, Полша).

## **3.2 Метод за изследване на вискозоеластични характеристики**

По време на експериментите, всеки един препарат (торакален или абдоминален) се окачва вертикално между две щипки и поставя в органна ваничка, където постоянно се облива с хранителния разтвор, аериран с газова смес от 5% O<sub>2</sub> / 95% CO<sub>2</sub> и затоплен до 37 °C. Препаратът се адаптира към експерименталните условия за период от 30 мин, след което се прилага специално създаден протокол за измерване на вискозоеластичните характеристики. През това време вторият препарат се оставя в хранителния разтвор, при температура от 4 °C.



**Фигура 1. Схема на метода на принудените трептения: 1. Лентовиден препарат, 2. Механизъм за създаване на синусоидални трептения, 3. Непрозрачна маска, 4. Фотоелемент, 5. Електронен преобразувател, 6. Аналогово-дискретен преобразувател (ADC), 7. Дисплей на сигналите, 8. Органна камера, 9. Перисталтична помпа, 10. Клапан, 11. Отвор, 12. Оловен пръстен (концентрирана маса), А - контейнер за разтвор № 1, В - контейнер за разтвор № 2.**

Окаченият препарат се изследва по метода на принудените трептения, широко описан в литературата (Stiesen et al., Antonova et al.). Съгласно метода на принудените трептения, нискочестотни синусоидални осцилации с постоянна амплитуда (смуцаващи трептения) се прилагат в горния край на препарата. Те предизвикват т.нар. принудени трептения в долния му край, които са със същата честота, но с различна амплитуда. При плавното изменение на честотата в интервала от 3 до 30 Hz с нарастващ и намаляващ ход, амплитудата на принудените трептения нараства и след това намалява. Нарастването на амплитудата до т.н. резонанс теоретично би трябвало да доведе до разкъсването на препарата, но амплитудите са ограничени до вътрешното триене, както и поради бързото преминаване през резонансната честота при експеримента. Графиката амплитудата на принудените трептения честота е известна като резонансна крива. Поради нелинейната еластичност на артериалната стена, резонансната крива не е симетрична, т.е. резонансният връх е наклонен, при това той е наклонен наляво при т.н. смекчаващ тип нелинейна еластичност и надясно – при т.н. затвърдяващ тип нелинейна еластичност. Antonova et al. установяват, че виталната артериална стена притежава нелинейна еластичност от затвърдяващ тип, а след девитализиране тя се променя в смекчаващ тип нелинейна еластичност. Този феномен е използван за валидиране на виталността на препаратите при всеки запис. В реалния случай се получава т.н. скок на амплитудата, който зависи от посоката на промяна на честотата.

В заимстваната от Stiesen et al., методика, масата на изследвания образец се разглежда като съсредоточена в една тежест, окачена в долния край на образца (концентрирана маса), която причинява опън, еквивалентен на приложено вътрешно налягане в цилиндричен сегмент, наричано „еквивалентно налягане“ или само „налягане“. Съгласно тази методика, в долния край на препарата последователно се

окачват 4 различни концентрирани маси, отговарящи на еквивалентно вътрелуменно налягане в границите на физиологично нормалното артериално налягане за плъх<sup>1</sup> – от 80,5 до 157,4 mmHg в нарастващ ред. За всяка окачена маса се правят записи на принудените трептения, при нарастване и намаляване на смущаващата честота. Така се получават няколко резонансни криви, от които се определят и пресмятат вискозоеластичните характеристики: собствена честота, динамичен модул на еластичност и коефициент на вискозност за съответните еквивалентни налягания. По време на записа се изключва перфузията с хранителния разтвор, за да не се прибавя допълнителна маса от количеството разтвор върху препарата към механичната система, което изменя математическия апарат за описването на принудените трептения.

В зависимост от това дали в хранителният разтвор има добавени едно или повече (агонист + антагонист) фармакологично активни вещества или не, проведените записи са групирани в четири категории:

1. Контролни записи – с чист хранителен разтвор (ХР).
2. Записи с едно от експерименталните вещества, опиоидни аналгетици, добавено към хранителния разтвор (ХР + ОА).
3. Записи с опиоидния антагонист налоксон, добавен към хранителния разтвор (ХР + НАЛ).
4. Записи с налоксон и един опиоиден аналгетик (ХР + НАЛ + ОА).

Последователността от действия по време на експериментите е описана в специално създадения експериментален протокол, който се спазва при изследване на вискозоеластичните характеристики за всеки препарат (Таблица 1). Този експериментален протокол гарантира запазването на виталността и на двата изследвани препарата в рамките на експеримента.

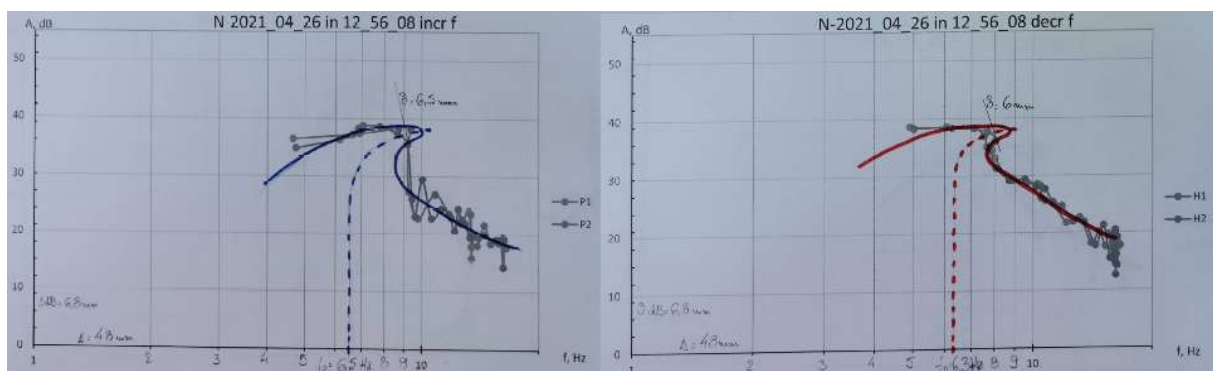
**Таблица 1. Експериментален протокол за изследване на вискозоеластични характеристики**

| Етап   | Време     | Описание   |
|--|-----------|--|
| Адаптация  | 30 мин    | Този етап се провежда еднократно само в началото на експеримента. При промяна в експерименталните условия се допуска 5 мин повторна адаптация.   |
| Контролни записи   | 5-6 мин   | От първата част на записа, след успокояване на сигнала, се взимат данни за статичната характеристика при съответната тежест. От останалата част на записа се получава резонансна крива, от която се измерват собствената честота $f_0$ , октавната дължина и ширината на 3 dB лента. От тези величини се изчислява динамичният модул на еластичност $E_{dyn}$ , както и коефициента на вискозни загуби $\beta$ . |
| Адаптация  | 5 мин     | Приема се като адаптация към промяната в условията.  |
| Кумулативно прилагане на нарастващи концентрации от опиоиден аналгетик | 15-20 мин | За всяка приложена концентрация: От първата част на записа, след успокояване на сигнала, се взимат данни за статичната характеристика при съответната тежест. От останалата част на записа се получават динамичните характеристики също при съответната тежест.  |
| Отмиване на веществото   | 30 мин    | Приема се, че за посоченото време на перфузия с чист хранителен разтвор, опиоидния аналгетик се отмива и неговото свързване с повърхностни клетъчни рецептори е прекратено.  |

<sup>1</sup> Понятието концентрирана маса означава, че цялата маса на системата препарат - окачена тежест - непрозрачна маска, е съсредоточена в масата на окачената тежест, т.е. останалите части на тази система се смятат за безтегловни, тъй като теглото им е пренебрежимо малко в сравнение с това на окачената тежест и е включено в нейната маса.

| Етап   | Време   | Описание   |
|--|---------|--|
| Контролни записи след отмиване на ОА             | 5-6 мин | Получените данни се използват за контрол на връщането към началните условия на експеримента.   |
| Перфузия с $10^{-6}$ М разтвор на налоксон       | 10 мин  | Приема се, че за посоченото време на перфузия с хранителен разтвор + $10^{-6}$ М налоксон, опиоидният антагонист се свързва с опиоидните рецептори и блокира тяхната активност.  |
| Записи с налоксон                                | 5-6 мин | Получените данни се използват за контрол на връщането към началните условия на експеримента при отчитане на антагонистичния ефекта от приложението на налоксон.  |
| Записи с опиоидния антагонист налоксон и един ОА | 15 мин  | За всяка приложена концентрация:<br>От първата част на записа, след успокояване на сигнала, се взимат данни за статичната характеристика при съответната тежест. От останалата част на записа се получават динамичните характеристики също при съответната тежест. |

Получените от всеки запис сигнали се обработват цифрово с помощта на софтуер Microsoft Excel® и OriginLab OriginPro®. От получените резонансни криви (Фигура 2) на принудените трептения се измерват стойностите на собствената честота, ширината на 3 dB лента и октавната дължина (оста на честотата е в логаритмичен мащаб). След това се изчислява стойността на динамичния модул на еластичност и коефициента на вискозните загуби (уравнения (1) и (2)), като се имат предвид размерите на изследвания препарат.



**Фигура 2.** Резонансни криви на принудените трептения при нарастващ (лява) и намаляващ (дясна) ход на честотата на смущаващите трептения. Точките и свързващата ги линия са от експерименталния запис, а с плътна синя и червена линия са очертани идеалните резонансни криви с наклонен връх.

(1)

$$E' = \frac{(2\pi f_0)^2 m(L_0 + \Delta L)}{S}$$

където:

$E'$  – динамичен модул на еластичност

$f_0$  – собствена честота

$m$  – тегло на окачената концентрирана маса

$L_0$  – начална дължина на препарата

$L$  – удължение на препарата, след окачване на концентрирана маса

$S$  – площ на напречното сечение на препарата

$\pi$  – 3,14159

(2)

$$\beta = 2\pi f_0 m \left( 2^{\left(\frac{\delta}{\Delta}\right)} - 1 \right)$$

където:

$f_0$  – собствена честота

$m$  – тегло на окачената концентрирана маса

$\Delta$  – октавна дължина

$\delta$  – 3 dB ширина

$\pi$  – 3,14159

### 3.3 Метод за изследване на съкратителна активност

Методът позволява директен анализ на взаимодействията между молекулите на приложеното експериментално вещество и рецепторите в целевата тъкан (при премахнати регулаторни механизми на организма и взаимодействие между медиатора и рецептора). Препаратите се закрепват в силиконизирани стъклени ванички с вместимост 4 ml, които се пълнят с хранителен разтвор, аериран с газова смес 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub> и temperиран до 37 °C. Единия край на препаратата се фиксира неподвижно, а другия се свързва с механоелектричен преобразувател за изометрично регистриране на гладкомускулни съкращения. За постигане на максимално близък до нормалното физиологично състояние тонус на гладките мускули, препаратите от аорта на плъх (10 mm в ширина и 1 mm дължина) се обтягат с напрежение еквивалентно на тежест от 2 g и се оставят да се адаптират. Съкратителната активност на гладкомускулните препарати се регистрира и записва с компютърна система.

За симулация на физиологичен нервен импулс се използва полева електрическа стимулация. Прилага се нискочестотна електрическа стимулация (англ. low-frequency electrical stimulation - LFES), която е подходяща за активиране на неврони и нервни терминали, без да се дразнят директно (неспецифично) гладкомускулните клетки: честота 0,05 Hz, 1 ms продължителност на импулса през интервал от 20 s и супрамаксимален волтаж.

За всеки от използваните опиоидни аналгетици (фентанил, трамадол) се прилага следния експериментален протокол:

- адаптиране на гладкомускулните препарати за период от 30-60 мин. преди началото на опита, при което разтвора във ваничките се сменя на всеки 10 до 15 минути;
- последователно въвеждане на разтвори с нарастваща концентрация на изследвания опиоиден аналгетик;
- перфузия на препаратите с хранителен разтвор;
- предварително третиране на препаратите с налоксон 10<sup>-6</sup> mol/l за 10 мин, без последваща перфузия с хран. разтвор;
- последователно въвеждане на разтвори с нарастваща концентрация на изследвания опиоиден аналгетик, в комбинация с опиоидния антагонист налоксон 10<sup>-6</sup> mol/l.

### 3.4 Методи за статистически анализ на получените данни

При работа с лабораторни животни, етичните норми и изискванията на Директива 2010/63/ЕС налагат намаляване на техния брой съгласно принципа на 3R (заместване, намаляване, усъвършенстване; *англ.* replacement, reduction, refinement). В този контекст, малкият размер на извадката ( $n < 15$ ) изисква адаптиране на статистическия подход за постигане на валидни резултати. За проверка на резултатите за статистическа значимост бяха използвани следните дескриптивни и сравнителни статистически методи:

#### 3.4.1 Дескриптивни методи

За описание на статистическите извадки на трите вискозоеластични характеристики собствена честота, модул на еластичност и коефициент на вискозни загуби бяха използвани средноаритметичната стойност ( $\bar{x}$ ) (или медиана, в случай на липсващо нормално разпределение на стойностите), като измерител на централната тенденция, а като мерки за разсейването около средната стойност – стандартното отклонение ( $s$ ) и стандартна грешка на средната стойност (SEM).

#### 3.4.2 Сравнителни методи

За да се оцени влиянието на 4-те независими променливи (еквивалентно артериално кръвно налягане, концентрация на приложеното вещество, възраст и пинеален статус на експерименталните животни) върху 3-те зависими променливи собствена честота ( $f_0$ ), модул на еластичност ( $E'$ ) и коефициент на вискозни загуби ( $\beta$ ), бяха използвани няколко отделни методи за сравнителен анализ. В зависимост от наличието на нормално разпределение на данните в извадките бяха използвани параметрични или непараметрични методи. За всички анализи беше определено ниво на статистическа значимост  $\alpha \leq 0,05$ .

За оценка на влиянието на възрастта на експерименталните животни без приложено вещество, в извадките с нормално разпределение на данните бе използван t-тест за независими извадки, докато в извадките без нормално разпределение бе използван непараметричният U тест на Mann-Whitney. За оценка на ефектите от посоката на промяна на честотата на смущаващите трептения (EFS) и в зависимост от наличието или липсата на нормално разпределение в извадките бяха използвани съответно t-тест за свързани извадки и тест на Wilcoxon. В зависимост от приложението тест за всяко едно междугрупово сравнение бе използвана съответната мярка за централна тенденция на извадката (средна стойност или медиана). За сравнение на средните стойности на  $f_0$ ,  $E'$  и  $\beta$  между групите, определени от възрастта и пинеалния статус на експерименталните животни, беше използван анализ на ковариацията (ANCOVA), при който нивото на еквивалентното кръвно налягане (4 нива) и концентрацията на приложения опиоиден аналгетик (4 нива) бяха приети за контролирани непрекъснати фактори (независими променливи, които са контролирани експериментално, но третирани като непрекъснати в анализа), а пинеалния статус (шам-оперирани, пинеалектомирани) и възрастта (3-, 14- и 18-месечни) като категорични фактори. Използвани са линейна и нелинейна регресия за оценка съответно на  $f_0$ ,  $\beta$  и  $E'$ , при което наклоните и височините/отрезките (за  $f_0$  и  $\beta$ ) и регресионните криви (за  $E'$ ) бяха сравнени за статистически значими разлики.

За статистическия анализ беше използван компютърен софтуер Minitab, версия 17 (Minitab, LLC, State College, Pennsylvania, USA), както и GraphPad Prism, версия 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA).

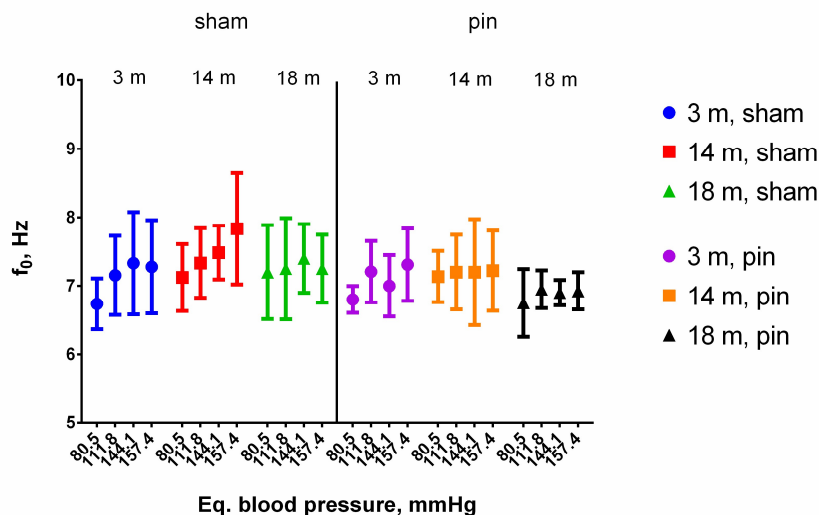
### 3.5 Ограничения на използваните методи

Използването на *in vitro* препарати има методологични ограничения като липсата на нервна и хуморална регулация от страна на организма, отсъствие на периваскуларната мастна тъкан, адвентицията и ендотела, които модулират тонуса и чувствителността на артериалния гладкомускулен слой към външни стимули. Освен това, изрязването на препаратите под ъгъл 60° спрямо надлъжната ос включва частичен аксиален компонент в измерваните параметри, което представлява известно отклонение от изцяло циркуферентния отговор. Основно предимство на прилагания подход е, че използваните методи позволяват количествено определяне на вискозоеластичните характеристики и съкратителната активност на изолирана аортна медиа, което допринася за разширяване на познанието за физиологичното значение на този основен структурен компонент на артериалната стена. Тази експериментална постановка елиминира вариабилността, свързана с индивидуалните различия в нервния и хуморален статус и съдовия тонус, и позволява директна оценка на механичния отговор на гладката мускулатура към фармакологично въздействие. Получените резултати с използваните методи биха могли само косвено да подкрепят или отхвърлят известните до момента фармакодинамични взаимодействия на фентанил и трамадол с клетъчни рецептори, поради което доказване на тяхната експресия и свързване с опиоидните аналгетици не беше цел на настоящата работа.

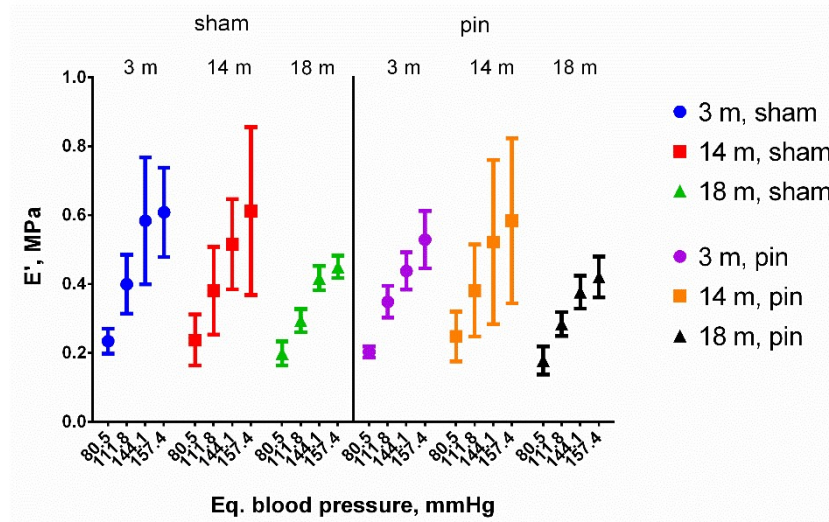
## 4. Резултати

### 4.1 Без опиоидни аналгетици

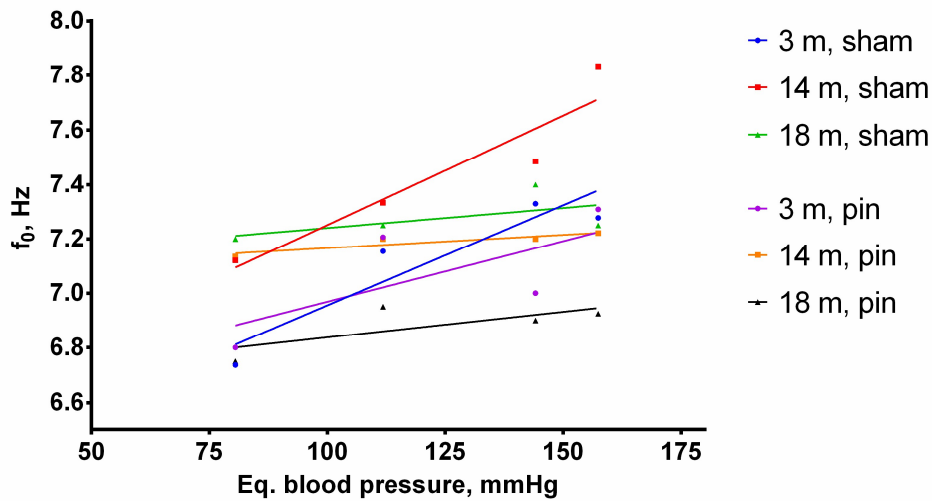
Направено е сравнение на вискозоеластичните характеристики между 3-, 14- и 18-месечни здрави (sham-оперирани; n = 11, 7, 4) и пинеалектомирани (pin-оперирани; n = 15, 7, 4) Wistar плъхове без прилагане на опиоидни аналгетици. Получените резултати в зависимост от еквивалентното кръвно налягане са представени в следващите графики.



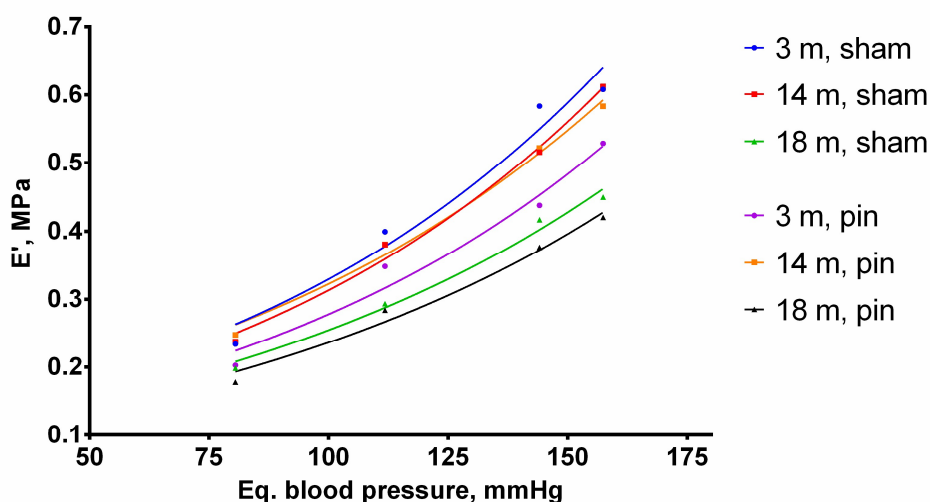
Фигура 3. Средни стойности на  $f_0$  ( $\pm 95\%$  CI) при 4 нива на еквивалентното кръвно налягане за всяка от трите възрасти (3, 14 и 18 м.) на sham и pin групите.



Фигура 4. Средни стойности на  $E'$  ( $\pm$  95% CI) при 4 нива на еквивалентното кръвно налягане за всяка от трите възрасти (3, 14 и 18 м.) на sham и pin групите.



Фигура 5. Най-подходящи регресионни прави за средните стойности на  $f_0$  като функция от еквивалентно кръвно налягане за всяка от трите възрасти (3, 14 и 18 м.) на sham и pin групите.



Фигура 6. Най-подходящи регресионни криви за средните стойности на  $E'$  като функция от еквивалентно кръвно налягане за всяка от трите възрасти (3, 14 и 18 м.) на sham и pin групите.

#### 4.1.1 Влияние на възрастта

Влиянието на възрастта оказва значителен ефект само върху  $E'$  на 18-месечните плъхове, при които е отчетено намаление в модула на еластичност както при сравнение с 3-месечни ( $p < 0,001$ ), така и с 14-месечни ( $p < 0,01$ ) плъхове (Таблица 2 и Фигура 6). Не е отчетена значителна промяна в зависимост от възрастта по отношение на  $f_0$ . Въпреки, че се наблюдава тенденция за увеличение на  $f_0$  и  $E'$  с повишаване на еквивалентното артериално кръвно налягане във всички възрасти на sham и pin групите, в най-значителна степен този ефект е потиснат при  $E'$  на аортните препарати от 18-месечни плъхове в sham групата и  $f_0$  от 14-месечни плъхове в pin групата (Таблица 3 и Таблица 4).

Таблица 2. Сравнение между регресионните криви на  $E'$  в аортни препарати от 3-, 14- и 18-месечни животни (sham група).

| Група 1     | Група 2     | p стойност |
|-------------|-------------|------------|
| 3 м., sham  | 14 м., sham | > 0,05     |
| 14 м., sham | 18 м., sham | 0,0021     |
| 3 м., sham  | 18 м., sham | 0,0004     |

Забележка: При  $p > 0,05$  се приема, че разликата не е статистически значителна.

Таблица 3. Средни стойности на  $f_0$  и  $E'$  в аортни препарати от 3-, 14- и 18-месечни животни при различни нива на еквивалентното налягане (sham група).

|             | n  | 80,5 mmHg | 111,8 mmHg | 144,1 mmHg | 157,4 mmHg |
|-------------|----|-----------|------------|------------|------------|
| $f_0$ , Hz  |    |           |            |            |            |
| 3 м., sham  | 11 | 6,736     | 7,155      | 7,330      | 7,278      |
| 14 м., sham | 7  | 7,121     | 7,333      | 7,486      | 7,833      |
| 18 м., sham | 4  | 7,200     | 7,250      | 7,400      | 7,250      |
| $E'$ , MPa  |    |           |            |            |            |
| 3 м., sham  | 11 | 0,234     | 0,399      | 0,583      | 0,608      |
| 14 м., sham | 7  | 0,237     | 0,380      | 0,516      | 0,612      |
| 18 м., sham | 4  | 0,198     | 0,294      | 0,417      | 0,449      |

Таблица 4. Средни стойности на  $f_0$  и  $E'$  в аортни препарати от 3-, 14- и 18-месечни животни при различни нива на еквивалентното налягане (pin група).

|            | n  | 80,5 mmHg | 111,8 mmHg | 144,1 mmHg | 157,4 mmHg |
|------------|----|-----------|------------|------------|------------|
| $f_0$      |    |           |            |            |            |
| 3 м., pin  | 15 | 6,800     | 7,207      | 7,000      | 7,309      |
| 14 м., pin | 7  | 7,136     | 7,200      | 7,200      | 7,221      |
| 18 м., pin | 4  | 6,750     | 6,950      | 6,900      | 6,925      |
| $E'$       |    |           |            |            |            |
| 3 м., pin  | 15 | 0,203     | 0,348      | 0,438      | 0,528      |
| 14 м., pin | 7  | 0,247     | 0,381      | 0,521      | 0,583      |
| 18 м., pin | 4  | 0,178     | 0,284      | 0,376      | 0,420      |

След проведен по-ранен анализ на данни с по-малка извадка аортни препарати, получени от здрави (неоперирани), 3- ( $n = 7$ ) и 14-месечни ( $n = 3$ ) мъжки Wistar плъхове, беше направено сравнение между средните стойности на двете възрастови групи при две отделни нива на еквивалентното кръвно налягане – 80,5 и 157,5 mmHg. За двете нива на налягането беше установено, че  $f_0$  е със значително по-висока средна стойност при 14-месечни спрямо 3-месечни плъхове, независимо от посоката на изменение на честота на смущаващите трептения (EFS, англ. excitation frequency sweep) – нарастваща или намаляваща. Също така беше отчетено, че  $E'$  има значително по-високи средни стойности за двете EFS, но само при най-ниското ниво на налягане – 80,5 mmHg. Не бяха открити значителни разлики в  $E'$  между двете възрастови групи при най-високото ниво на налягане – 157,4 mmHg, както при нарастваща, така и при намаляваща честота на смущаващите трептения (Таблица 5). За разлика от тях, коефициентът на вискозни загуби ( $\beta$ ) не се различава значително между двете възрастови групи при двете посоки на промяна честотата и при всяко ниво на налягане.

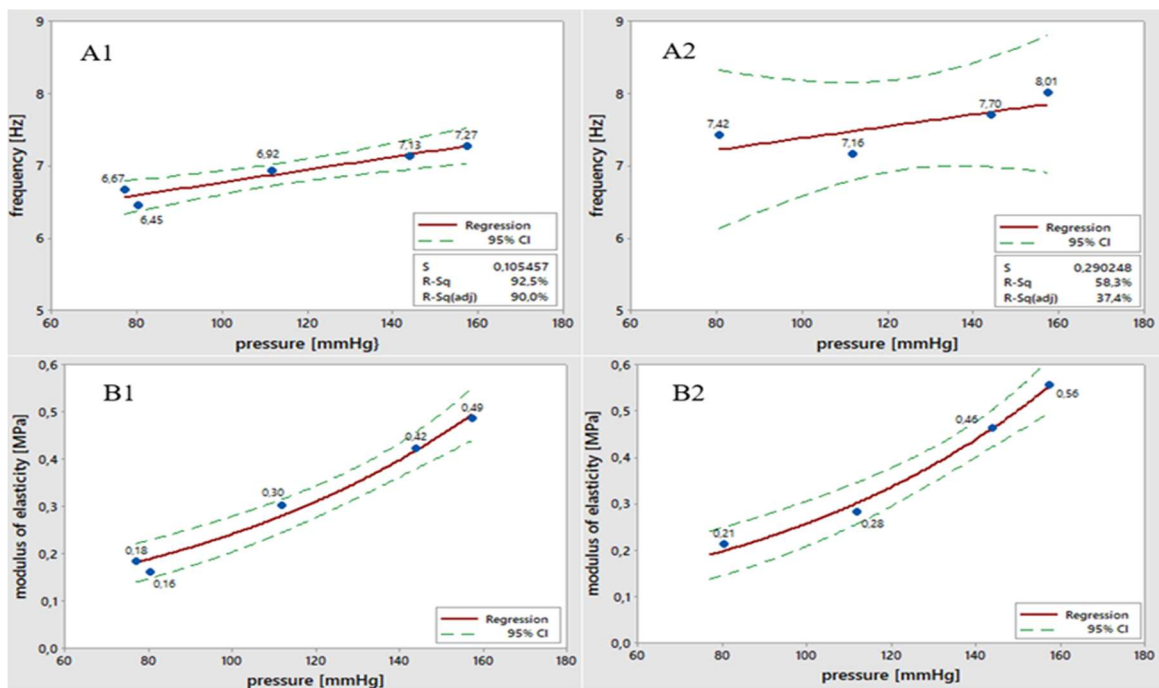
При сравнение на двете EFS бяха открити значителни разлики и в двете възрастови групи по отношение на  $f_0$  при 80,5 и 157,4 mmHg – във всички случаи  $f_0$  е с по-високи средни стойности при нарастваща честота на смущаващите трептения, отколкото при намаляваща. Също така бе установено, че с изключение на 14-месечните при 80,5 mmHg във всички останали случаи модулът на еластичност е със значително по-високи стойности при нарастваща честота на смущаващите трептения, отколкото при намаляваща (Таблица 6). За  $\beta$  нямаше статистически значими разлики между всички изследвани групи.

Таблица 5. Сравнение на средните стойности за  $f_0$  и  $E'$  между групите на 3- и 14-месечните плъхове, при нарастваща и намаляваща честота на смущаващите трептения (EFS) и две нива на еквивалентното кръвно налягане

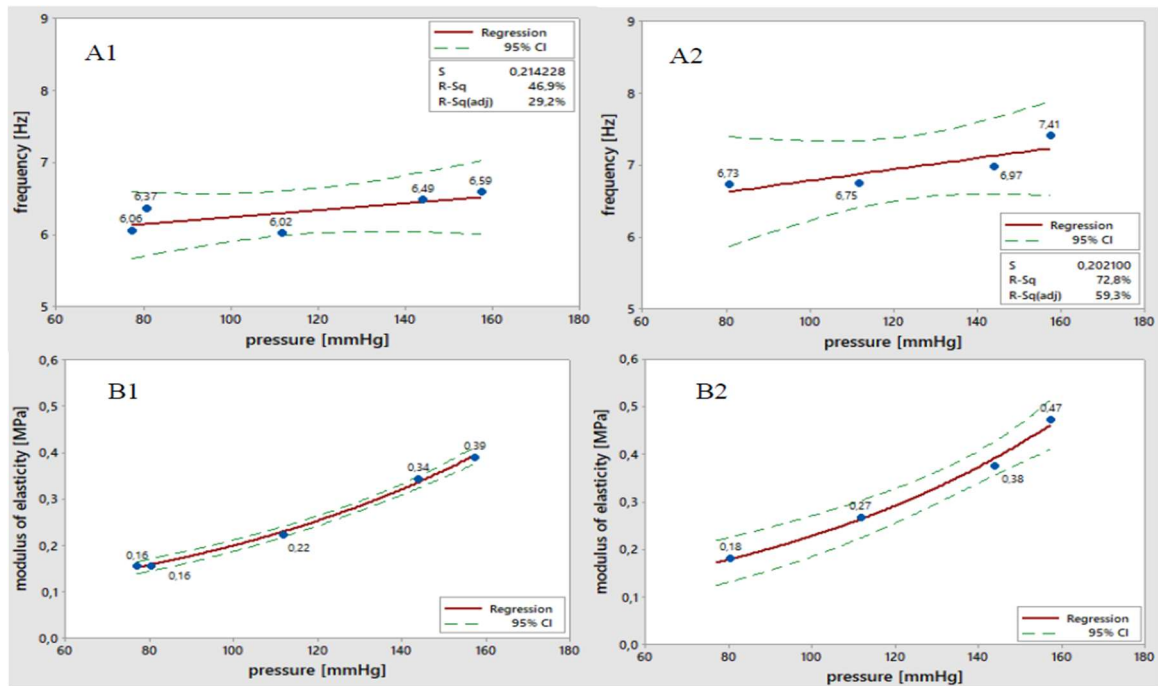
|       | Еквивал. налягане [mmHg] | Възраст | Нарастваща EFS      |                                     |            | Намаляваща EFS      |                                     |             |
|-------|--------------------------|---------|---------------------|-------------------------------------|------------|---------------------|-------------------------------------|-------------|
|       |                          |         | Средна стойност     | Разлика ( $\bar{x}_2 - \bar{x}_1$ ) | p стойност | Средна стойност     | Разлика ( $\bar{x}_2 - \bar{x}_1$ ) | p стойност  |
| $f_0$ | 80,5                     | 3 м.    | $\bar{x}_1 = 6,45$  | 0,964                               | $p < 0,01$ | $\bar{x}_1 = 6,06$  | 0,666                               | $p < 0,01$  |
|       |                          | 14 м.   | $\bar{x}_2 = 7,42$  |                                     |            | $\bar{x}_2 = 6,73$  |                                     |             |
|       | 157,4                    | 3 м.    | $\bar{x}_1 = 7,27$  | 0,738                               | $p < 0,01$ | $\bar{x}_1 = 6,59$  | 0,825                               | $p = 0,024$ |
|       |                          | 14 м.   | $\bar{x}_2 = 8,01$  |                                     |            | $\bar{x}_2 = 7,41$  |                                     |             |
| $E'$  | 80,5                     | 3 м.    | $\bar{x}_1 = 0,176$ | 0,037                               | $p < 0,01$ | $\bar{x}_1 = 0,156$ | 0,0252                              | $p = 0,044$ |
|       |                          | 14 м.   | $\bar{x}_2 = 0,213$ |                                     |            | $\bar{x}_2 = 0,182$ |                                     |             |
|       | 157,4                    | 3 м.    | $\bar{x}_1 = 0,486$ | 0,070                               | $p = 0,10$ | $\bar{x}_1 = 0,390$ | 0,0834                              | $p = 0,11$  |
|       |                          | 14 м.   | $\bar{x}_2 = 0,556$ |                                     |            | $\bar{x}_2 = 0,473$ |                                     |             |

Таблица 6. Сравнение на средните стойности за  $f_0$  и  $E'$  между групите на нарастваща и намаляваща честота на смущаващите трептения (EFS), във всяка от групите на 3- и 14-месечните плъхове при две нива на еквивалентното кръвно налягане

| Еквивал. налягане | Групи | Разлика                                      | 95% CI за разликата | p стойност      |       |
|-------------------|-------|--|---------------------|-----------------|-------|
| 80,5 mmHg         | $f_0$ | 3 м., нараств. EFS спрямо 3 м., намал. EFS   | 0,392               | 0,047; 0,738    | 0,029 |
|                   |       | 14 м., нараств. EFS спрямо 14 м., намал. EFS | 0,691               | 0,253; 1,129    | 0,006 |
|                   | $E'$  | 3 м., нараств. EFS спрямо 3 м., намал. EFS   | 0,0162              | -0,0117; 0,0441 | 0,226 |
|                   |       | 14 м., нараств. EFS спрямо 14 м., намал. EFS | 0,0312              | 0,0097; 0,0527  | 0,010 |
| 157,4 mmHg        | $f_0$ | 3 м., нараств. EFS спрямо 3 м., намал. EFS   | 0,710               | 0,375; 1,046    | 0,000 |
|                   |       | 14 м., нараств. EFS спрямо 14 м., намал. EFS | 0,600               | 0,362; 0,838    | 0,000 |
|                   | $E'$  | 3 м., нараств. EFS спрямо 3 м., намал. EFS   | 0,1019              | 0,0576; 0,1463  | 0,000 |
|                   |       | 14 м., нараств. EFS спрямо 14 м., намал. EFS | 0,0825              | 0,0563; 0,1087  | 0,000 |



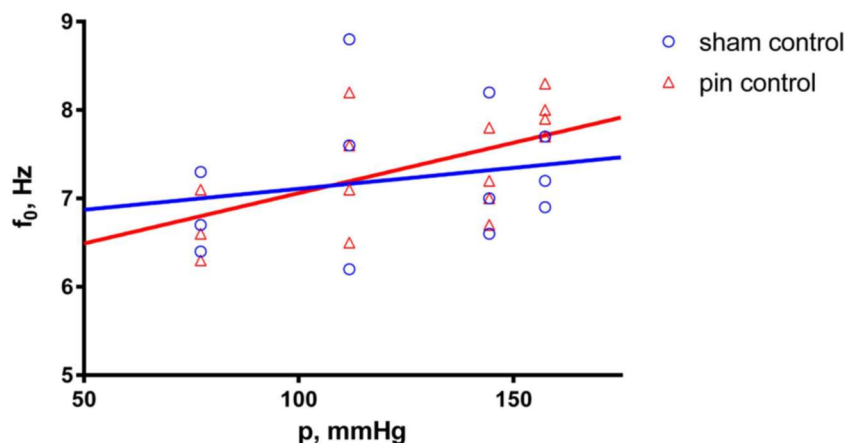
Фигура 7. Най-добри регресионни прави/криви за  $f_0$  (A) и  $E'$  (B) спрямо еквивалентното кръвно налягане на 3 месеца (вляво, 1) и 14 месеца (вдясно, 2), при нарастваща честота на смущаващите трептения.



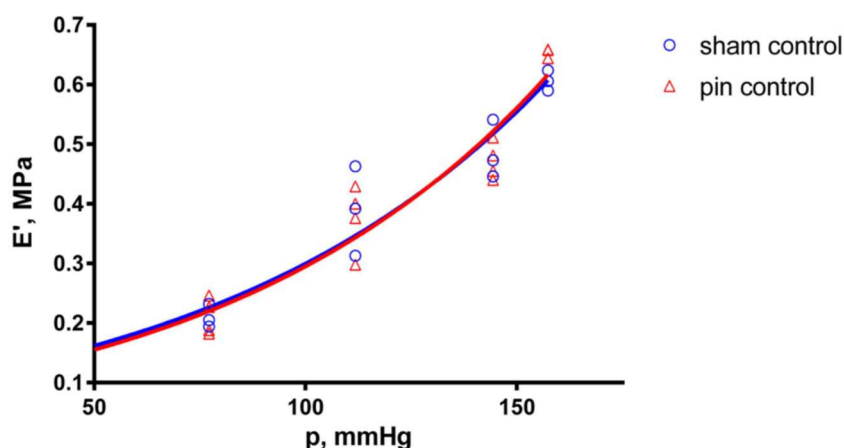
Фигура 8. Най-добри регресионни прави/криви за  $f_0$  (A) и  $E'$  (B) спрямо еквивалентното кръвно налягане на 3 месеца (вляво, 1) и 14 месеца (вдясно, 2), при намаляваща честота на смущаващите трептения.

#### 4.1.2 Влияние на мелатониновия дефицит

След първоначален анализ на данни само от 3-месечни животни, получени на база по-малка извадка аортни препарати от sham ( $n = 3$ ) и pin ( $n = 4$ ) групите, не беше открита съществена разлика между контролните измервания в двете групи. При този анализ допълнително беше потвърдено, че след контролното измерване както в sham, така и в pin групата собствената честота ( $f_0$ ) нараства линейно с увеличаване на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) (Фигура 9), докато динамичният модул на еластичност ( $E'$ ) нараства експоненциално (Фигура 10).



Фигура 9. Собствена честота ( $f_0$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ). Сравнение на ефекта между sham ( $n = 3$ ) и pin ( $n = 4$ ) групата при контролното измерване. Плътните линии показват най-подходящия регресионен модел: синя – sham група; червена – pin група.



Фигура 10. Модул на еластичност ( $E'$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ). Сравнение на ефекта между sham ( $n = 3$ ) и pin ( $n = 4$ ) групата, с измервания направени след контролно измерване. Плътните криви показват най-подходящия регресионен модел: синя – sham група; червена – pin група.

При последващ анализ на данни, получени на база по-голяма извадка аортни препарати от sham и pin групите на 3-, 14- и 18-месечни плъхове (броят във всяка група е представен в Таблица 7), бе установено, че в сравнение с шам операция, пинеалектомията (мелатонинов дефицит) води до значително намален  $E'$  в 3- ( $p < 0,001$ ) и 18-месечните ( $p < 0,05$ ) възрастови групи (Таблица 9 и Фигура 6), докато  $f_0$  е значително намалена само в 18-месечната група ( $p < 0,001$ ) (Таблица 8 и Фигура 5). В този случай може да се приеме, че отчетената статистическа значимост е закономерна предвид по-големия размер на изследваната извадка в сравнение с първоначалния анализ, който включва данни само от 3-месечни плъхове.

Таблица 7. Разпределение на броя експериментални плъхове според мелатониновия статус и възрастовата група

| Мелатонинов статус<br>Възраст на экс. животни | Шам-оперирани<br>(sham група) | Пинеалектомирани<br>(pin група) |
|---|-------------------------------|---------------------------------|
| 3-месечни                                     | $n = 11$                      | $n = 15$                        |
| 14-месечни                                    | $n = 7$                       | $n = 7$                         |
| 18-месечни                                    | $n = 4$                       | $n = 4$                         |

Таблица 8. Сравнение между регресионните прави на  $f_0$  в аортни препарати от 3-, 14- и 18-месечни животни

| Група 1     | Група 2    | $p$ стойност |
|-------------|------------|--------------|
| 3 м., sham  | 3 м., pin  | $> 0,05$     |
| 14 м., sham | 14 м., pin | $> 0,05$     |
| 18 м., sham | 18 м., pin | 0,0006 *     |

Забележка: При  $p > 0,05$  се приема, че разликата не е статистически значителна. \* В групата на 18-месечните плъхове значимостта е изчислена спрямо разликата между отреза на регресионните прави. В същата група не е отчетена значителна разлика по отношение на наклона на правите.

Таблица 9. Сравнение между регресионните криви на  $E'$  в аортни препарати от 3-, 14- и 18-месечни животни

| Група 1     | Група 2    | $p$ стойност |
|-------------|------------|--------------|
| 3 м., sham  | 3 м., pin  | 0,0003       |
| 14 м., sham | 14 м., pin | $> 0,05$     |
| 18 м., sham | 18 м., pin | 0,0362       |

Забележка: При  $p > 0,05$  се приема, че разликата не е статистически значителна.

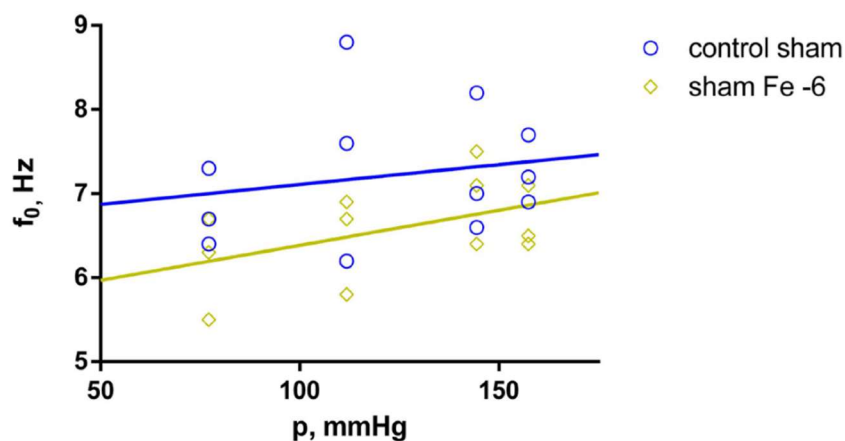
## 4.2 Фентанил

С цел да бъде изследвано влиянието на опиоидните аналгетици фентанил и трамадол, както и техните концентрация-ефект зависимости спрямо вискозоеластичните характеристики на аортни препарати от здрави (sham-оперирани) и пинеалектомирани (pin-оперирани) Wistar плъхове при две възрасти (3 и 14 м.), бяха проведени експерименти, а получените резултати са представени в следващите подточки. Изследван също така бе и ефектът от прилагането на опиоидния антагонист налоксон в концентрация от  $10^{-6}$  mol/L, както самостоятелно, така и в комбинация с всяка една от използваните концентрации опиоиден аналгетик.

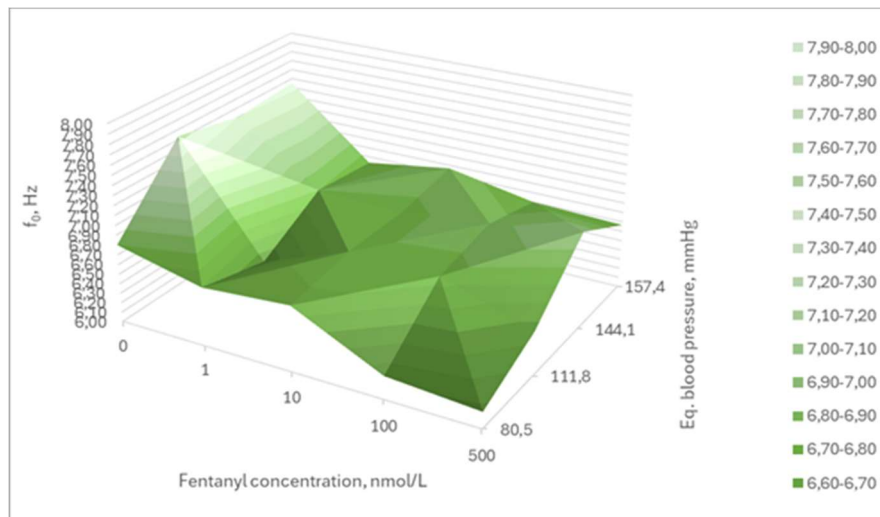
### 4.2.1 Ефекти на фентанил в sham групата

#### 4.2.1.1 3-месечни плъхове

В групата на 3-месечните, sham-оперирани плъхове бе установено, че кумулативно въведени нарастващи концентрации на фентанил ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  и  $5 \times 10^{-7}$  mol/L) водят до значително по-ниски стойности на  $f_0$  в сравнение с контролното измерване само при най-високата концентрация на фентанил –  $5 \times 10^{-7}$  ( $10^{-6,3}$ ) mol/L ( $p < 0,035$ ). С изключение на гранична значимост при концентрация на фентанил  $10^{-7}$  mol/L ( $p = 0,054$ ), където  $f_0$  е по-ниска спрямо контролното измерване, други значителни разлики не бяха открити. Подобно на установеното с контролните измервания, в присъствие на фентанил също се открива линейно нарастване на собствената честота на препаратите с увеличаване на еквивалентното артериално кръвно налягане (Фигура 11).

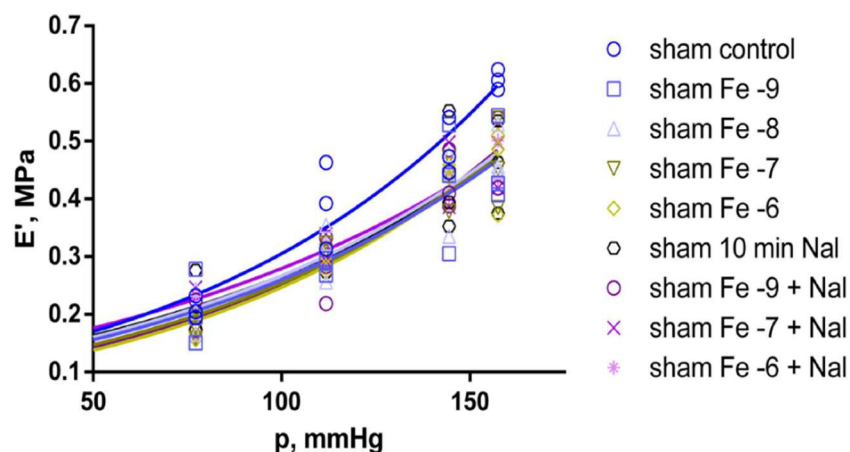


Фигура 11. Собствена честота ( $f_0$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 3-месечни плъхове. Сравнение на значителния ефект в рамките на sham групата ( $n = 3$ ) с измервания направени след контрола и след приложение на фентанил  $10^{-6,3}$  mol/L (Fe -6). Плътните прави показват най-подходящия регресионен модел (синя – контролно измерване; тъмно жълта – фентанил  $10^{-6,3}$  mol/L).



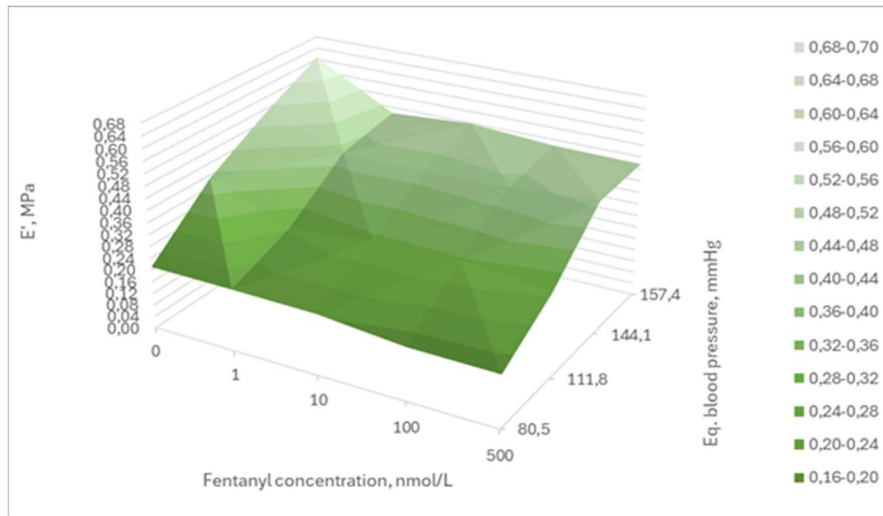
**Фигура 12.** Surface plot на собствената честота ( $f_0$ ) в зависимост от концентрацията на фентанил и еквивалентното кръвно налягане при 3-месечни sham плъхове.

За разлика от собствената честота,  $E'$  е значително по-нисък ( $p < 0,05$ ) при всички прилагани концентрации на фентанил в сравнение с контролното измерване в sham групата. Измерванията направени след 30-минутната перфузия с чист хранителен разтвор, след последната приложена концентрация на фентанил, доведоха до почти пълно възстановяване на модула на еластичност до контролното ниво. Освен това  $E'$  отново беше значително намален след последващото 10-минутно третиране с  $10^{-6}$  mol/L налоксон ( $p < 0,015$ ). С изключение на  $10^{-8}$  mol/L фентанил, последващото третиране с всички нарастващи концентрации на фентанил, в комбинация с  $10^{-6}$  mol/L налоксон, запази модула на еластичност значително по-нисък ( $p < 0,015$ ) от контролното измерване в sham групата на 3-месечни плъхове (Фигура 13). Не са установени статистически значими разлики в средните стойности между отделните концентрации фентанил. На Фигура 12 и Фигура 14 са представени 3D графики на повърхност (т.нар. surface plot), показващи зависимостта на всяка вискозоеластична характеристика едновременно от еквивалентното кръвно налягане и концентрацията на фентанил.



**Фигура 13.** Модул на еластичност ( $E'$ ) в зависимост от еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 3-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти в рамките на sham групата ( $n = 3$ ) с измервания направени след контрола, след  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  и  $10^{-6.3}$  mol/L фентанил (Fe -9, Fe -8, Fe -7 и Fe -6), 10 min  $10^{-6}$  mol/L налоксон (10 min Nal) и  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  и  $10^{-6.3}$  фентанил +  $10^{-6}$  mol/L налоксон (Fe -9 + Nal, Fe -7 + Nal, Fe -6 + Nal). Плътните криви показват най-подходящия регресионен модел (тъмносива – контролно измерване; синя – фентанил  $10^{-9}$ ; светлосива –  $10^{-8}$ ; тъмно жълта – фентанил

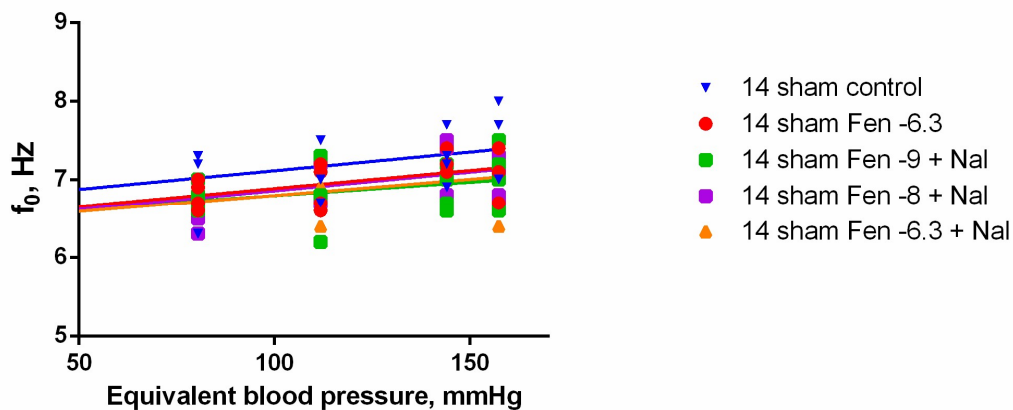
10<sup>-7</sup>; светложълта – фентанил 10<sup>-6,3</sup>; черна – след 10 минути 10<sup>-6</sup> налоксон; тъмнолилава – фентанил 10<sup>-9</sup> + налоксон; лилава – фентанил 10<sup>-7</sup> + налоксон; светлолилава – фентанил 10<sup>-6,3</sup> mol/L + налоксон).



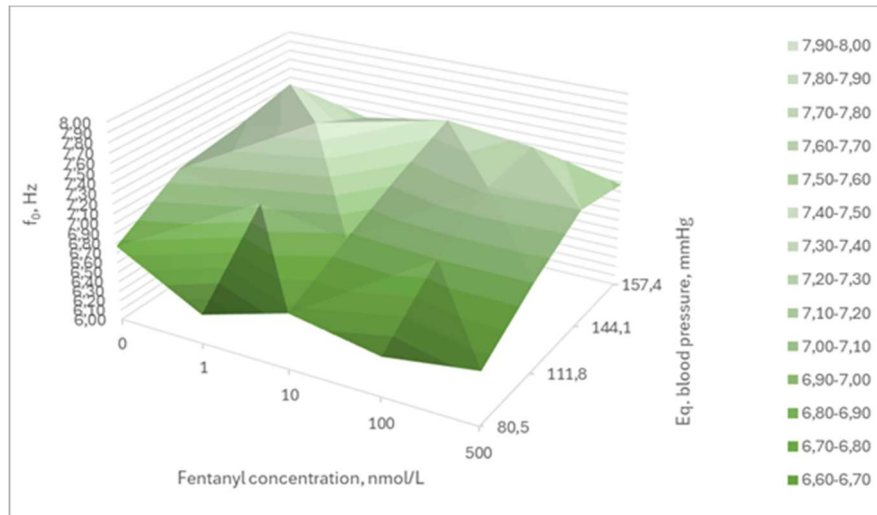
Фигура 14. Surface plot на модула на еластичност (E) в зависимост от концентрацията на фентанил и еквивалентното кръвно налягане при 3-месечни sham плъхове.

#### 4.2.1.2 14-месечни плъхове

В групата на 14-месечните, sham-оперирани плъхове бе установено, че въздействието на самостоятелното въвеждане на някои концентрации на фентанил, както и въвеждането му съвместно с налоксон, води до значително по-ниски средни стойности на  $f_0$  в сравнение с контролното измерване в същата група. Такива понижения са отчетени след 10<sup>-6,3</sup> ( $5 \times 10^{-7}$ ) mol/L фентанил ( $p = 0,05$ ), както и след 10<sup>-9</sup> + Nal ( $p < 0,01$ ), 10<sup>-8</sup> + Nal ( $p < 0,05$ ) и 10<sup>-6,3</sup> ( $5 \times 10^{-7}$ ) + Nal ( $p < 0,05$ ).

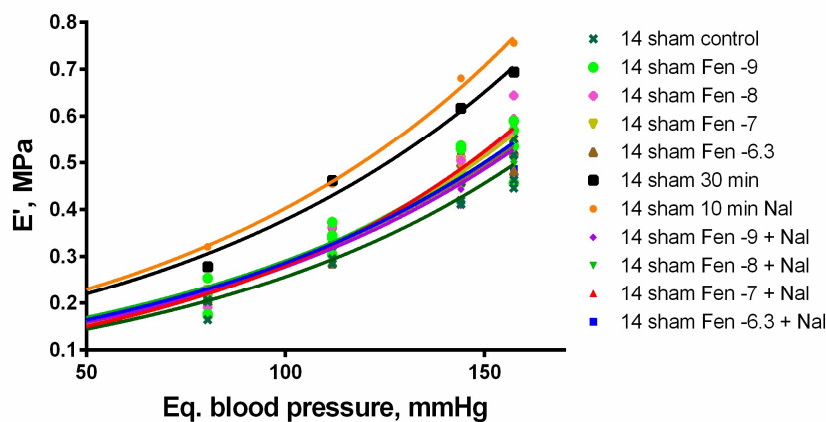


Фигура 15. Собствена честота ( $f_0$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 14-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти в рамките на sham групата ( $n = 4$ ) с измервания направени след контрола, 10<sup>-6,3</sup> ( $5 \times 10^{-7}$ ) mol/L фентанил (Fen -6,3), 10<sup>-9</sup> фентанил + 10<sup>-6</sup> налоксон (Fe -9 + Nal), 10<sup>-8</sup> фентанил + 10<sup>-6</sup> налоксон (Fe -8 + Nal) и 10<sup>-6,3</sup> ( $5 \times 10^{-7}$ ) фентанил + 10<sup>-6</sup> налоксон (Fe -6.3 + Nal). Плътните прави показват най-подходящия регресионен модел (синя – контролно измерване; червена – след фентанил 10<sup>-6,3</sup>; зелена – след фентанил 10<sup>-9</sup> + Nal; лилава – след фентанил 10<sup>-8</sup> + Nal; оранжева – след фентанил 10<sup>-6,3</sup> mol/L + Nal).



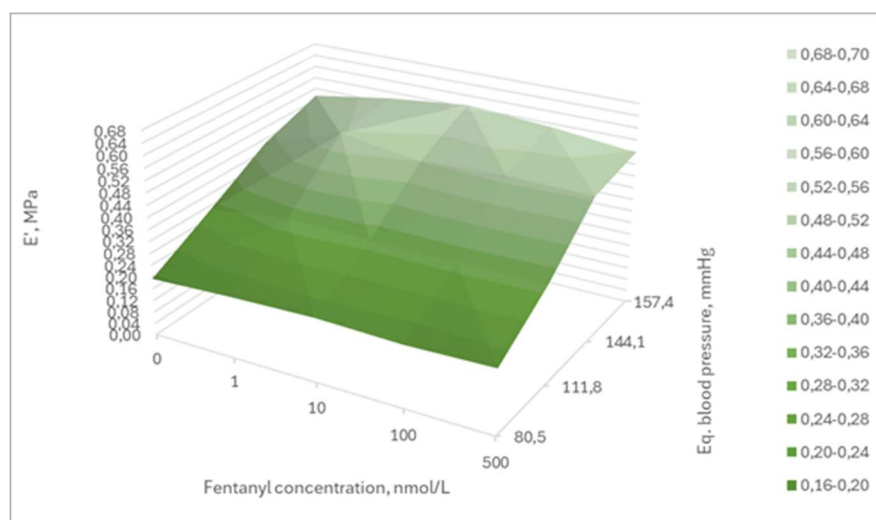
**Фигура 16.** Surface plot на собствената честота ( $f_0$ ) в зависимост от концентрацията на фентанил и еквивалентното кръвно налягане при 14-месечни sham плъхове.

Обратно на понижаващия ефект върху  $f_0$ , установен с някои от концентрациите на фентанил и фентанил + налоксон, значително по-високи стойности на модула на еластичност ( $p < 0,05$ ) спрямо контролното измерване са получени с всички приложени разтвори фентанил, налоксон и фентанил + налоксон, сравнявайки построените регресионни криви в зависимост от еквивалентното кръвно налягане (Фигура 17). Характерна особеност на наблюдавания ефект е, че средните стойности за  $E'$  съответно и интерполираните регресионни криви, получени при прилагане на фентанил, без значение от неговата концентрация, са значително по-ниски в сравнение с получените след 30-минутната перфузия с чист хранителен разтвор, както и след 10-минутната перфузия с  $10^{-6}$  М налоксон. Отново, статистически значими разлики в средните стойности между ефектите с отделните концентрации фентанил не са установени. Графики на зависимостта концентрация-ефект, съответно за  $f_0$  и  $E'$ , са представени на Фигура 16 и Фигура 18 като 3D графики на повърхност (т.нар. surface plot), показващи зависимостта на всяка вискозоеластична характеристика едновременно от еквивалентното кръвно налягане и концентрацията на фентанил, а на Фигура 17 – сравнение на значителните ефекти върху  $E'$  в зависимост от еквивалентното кръвно налягане.



**Фигура 17.** Модул на еластичност ( $E'$ ) в зависимост от еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 14-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти в рамките на sham групата ( $n = 4$ ) с

измервания направени след всички приложени концентрации на фентанил, налоксон и фентанил + налоксон.

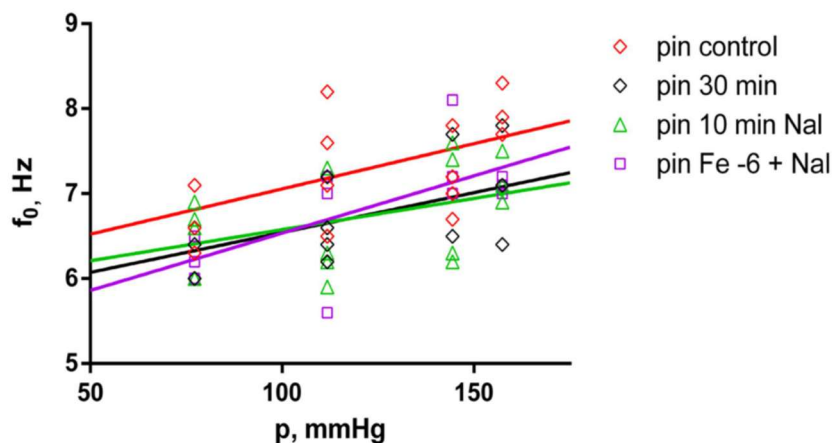


Фигура 18. Surface plot на модула на еластичност ( $E'$ ) в зависимост от концентрацията на фентанил и еквивалентното кръвно налягане при 14-месечни sham пълхове.

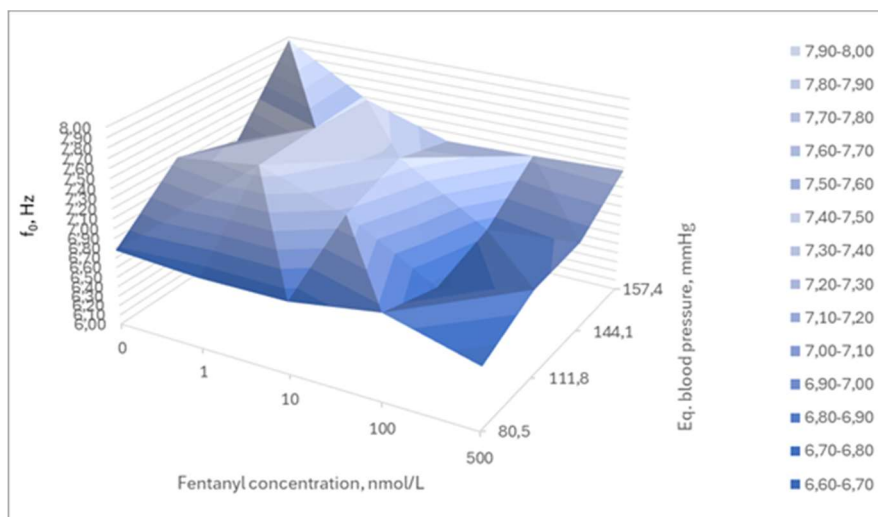
## 4.2.2 Ефекти на фентанил в рип групата

### 4.2.2.1 3-месечни пълхове

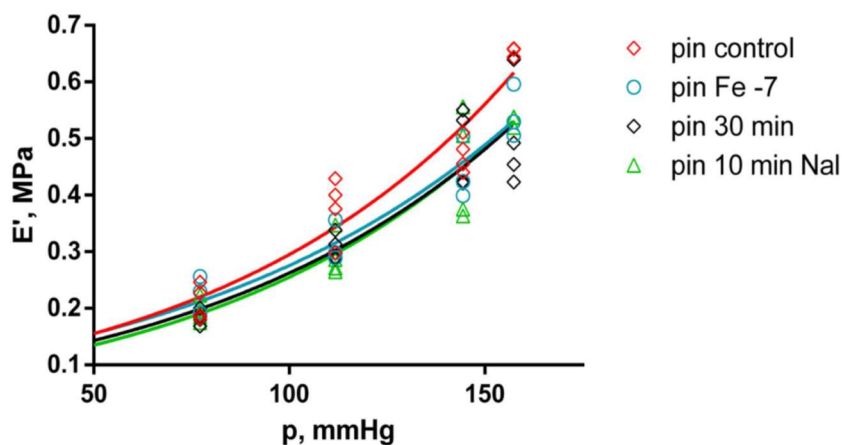
В рип групата сравнението между ефектите на различните вещества и контролното измерване показва, че  $f_0$  е значително по-нисък след 30-минутната перфузия с чист хранителен разтвор ( $p < 0,015$ ), след последната приложена концентрация на фентанил, както и след последващото 10-минутно третиране с  $10^{-6}$  mol/L налоксон ( $p < 0,015$ ), и отново след  $5 \times 10^{-7}$  ( $10^{-6,3}$ ) mol/L фентанил +  $10^{-6}$  mol/L налоксон ( $p < 0,035$ ) (Фигура 19). Установено е също, че  $E'$  е значително по-нисък в сравнение с контролното измерване в рип групата при  $10^{-7}$  mol/L фентанил ( $p < 0,035$ ), след 30-минутната перфузия с чист хранителен разтвор ( $p < 0,035$ ), след последната приложена концентрация на фентанил, както и след последващото 10-минутно третиране с  $10^{-6}$  mol/L налоксон ( $p < 0,015$ ) (Фигура 21). Подобно на данните получени с sham групата, статистически значими разлики в средните стойности между отделните концентрации фентанил не са установени. Графики на зависимостта концентрация-ефект, съответно за  $f_0$  и  $E'$ , са представени на Фигура 20 и Фигура 22 като 3D графики на повърхност (т.нар. surface plot), показващи зависимостта на всяка вискозоеластична характеристика едновременно от еквивалентното кръвно налягане и концентрацията на фентанил.



Фигура 19. Собствена честота ( $f_0$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 3-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти в рамките на  $\text{pin}$  групата ( $n = 4$ ) с измервания направени след контрола, 30 минути перфузия, 10 минути  $10^{-6}$  mol/L налоксон (10 минути Nal) и  $10^{-6.3}$  фентанил +  $10^{-6}$  mol/L налоксон (Fe -6 + Nal). Плътните прави показват най-подходящия регресионен модел (червена – контролно измерване в  $\text{pin}$  групата; черна –  $\text{pin}$  група след 30 минути перфузия; зелена –  $\text{pin}$  група след 10 минути налоксон; лилава –  $\text{pin}$  група с Fe -6 + налоксон).

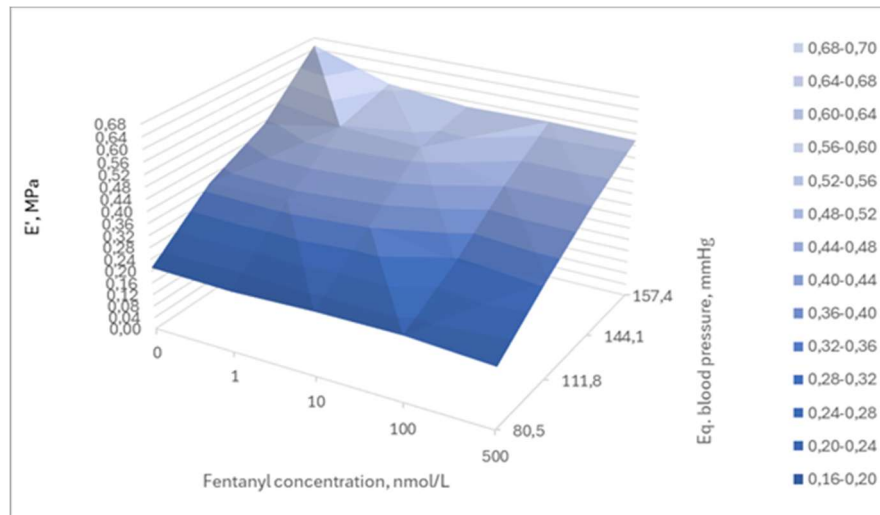


Фигура 20. Surface plot на собствената честота ( $f_0$ ) в зависимост от концентрацията на фентанил и еквивалентното кръвно налягане при 3-месечни  $\text{pin}$  плъхове.



Фигура 21. Модул на еластичност ( $E'$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 3-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти в рамките на  $\text{pin}$  групата ( $n = 4$ ), с измервания

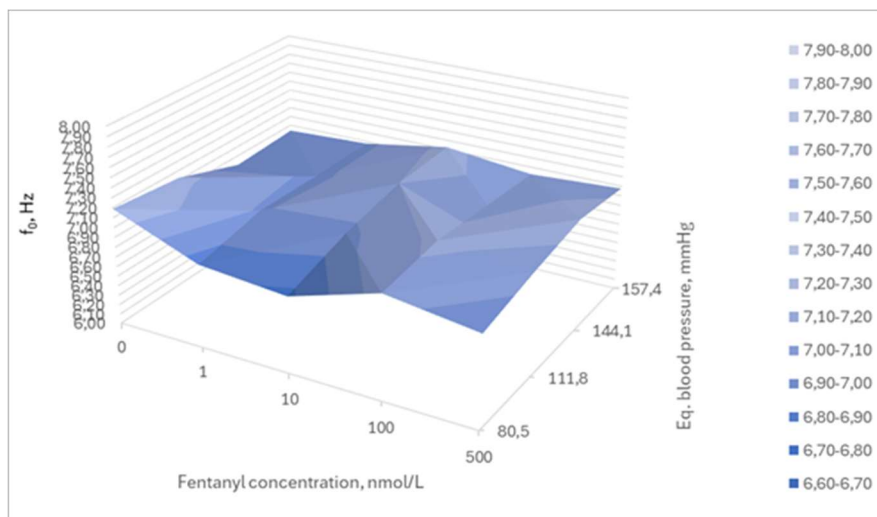
направени след контролата,  $10^{-7}$  фентанил (Fe -7), 30 минути перфузия и 10 минути  $10^{-6}$  mol/L налоксон (10 минути Nal). Плътните криви показват най-подходящия регресионен модел (червена – контролно измерване в рiп групата; светлосиня – рiп група с Fe -7; черна – рiп група след 30 минути перфузия; зелена – рiп група след 10 минути налоксон).



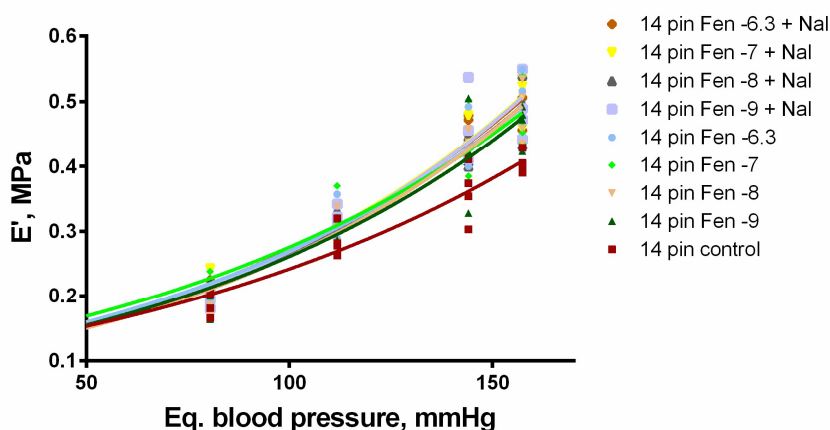
**Фигура 22.** Surface plot на модула на еластичност ( $E'$ ) в зависимост от концентрацията на фентанил и еквивалентното кръвно налягане при 3-месечни рiп плъхове.

#### 4.2.2.2 14-месечни плъхове

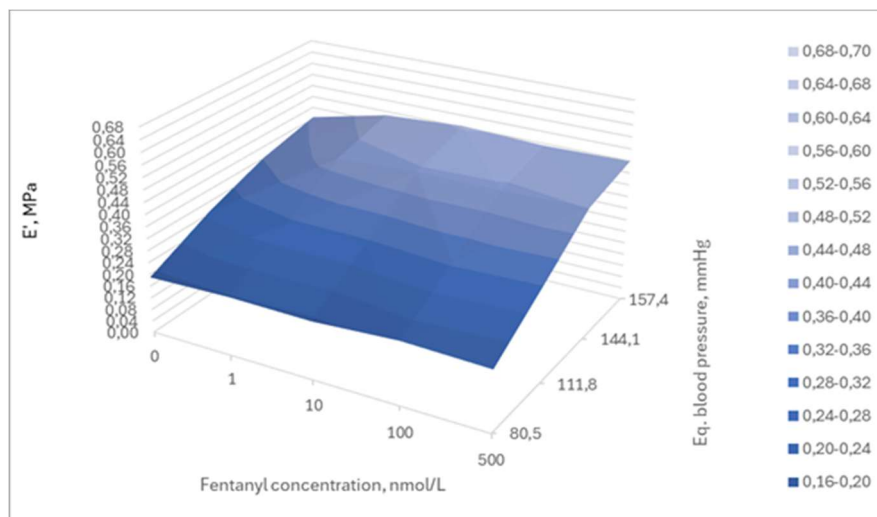
В групата на 14-месечните, рiп-оперирани плъхове бе установено, че спрямо контролното измерване въздействието с всяка една концентрация на фентанил, както самостоятелно, така и в комбинация с  $10^{-6}$  mol/L налоксон няма статистически значим ефект върху собствената честота на препаратите от торакална аорта. За разлика от  $f_0$  при модула на еластичност беше отчетено значително повишение на средните стойности в зависимост от еквивалентното кръвно налягане, при сравнение на всички концентрации фентанил и фентанил +  $10^{-6}$  mol/L налоксон с контролното измерване ( $p < 0,01$ ). 30-минутната перфузия с чист хранителен разтвор и последващото 10-минутно въздействие с разтвор на налоксон, в концентрация  $10^{-6}$  mol/L, не показват значително по-различно ниво на  $E'$  от това, отчетено при контролното измерване. Както при данните получени с 3-месечните плъхове в рiп групата, статистически значими разлики в средните стойности между отделните концентрации фентанил не са установени при 14-месечните. Графики на зависимостта концентрация-ефект, съответно за  $f_0$  и  $E'$ , са представени на Фигура 23 и Фигура 25 като 3D графики на повърхност (т.нар. surface plot), показващи зависимостта на всяка вискозоеластична характеристика едновременно от еквивалентното кръвно налягане и концентрацията на фентанил.



Фигура 23. Surface plot на собствената честота ( $f_0$ ) в зависимост от концентрацията на фентанил и еквивалентното кръвно налягане при 14-месечни рип плъхове.



Фигура 24. Модул на еластичност ( $E'$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 14-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти в рамките на рип групата ( $n = 4$ ), с измервания направени след контролата (pin control),  $10^{-9}$  фентанил (Fen -9),  $10^{-8}$  фентанил (Fen -8),  $10^{-7}$  фентанил (Fen -7),  $10^{-6.3}$  фентанил (Fen -6.3),  $10^{-9}$  фентанил +  $10^{-6}$  налоксон (Fen -9 + Nal),  $10^{-8}$  фентанил +  $10^{-6}$  налоксон (Fen -8 + Nal),  $10^{-7}$  фентанил +  $10^{-6}$  налоксон (Fen -7 + Nal) и  $10^{-6.3}$  фентанил +  $10^{-6}$  mol/L налоксон (Fen -6.3 + Nal). Плътните криви показват най-подходящия регресионен модел (тъмно червена – контролно измерване в рип групата; тъмнозелена – с Fen -9; бежова – с Fen -8; светлозелена – с Fen -7; светлосиня – с Fen -6.3; сивосиня - с Fen -9 + Nal; тъмносива – с Fen -8 + Nal; жълта – с Fen -7 + Nal; светлокафява – с Fen -6.3 + Nal).

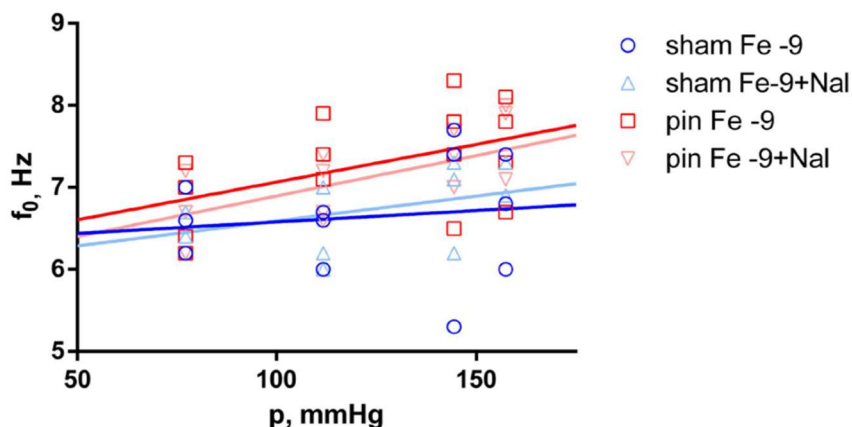


Фигура 25. Surface plot на модула на еластичност ( $E'$ ) в зависимост от концентрацията на фентанил и еквивалентното кръвно налягане при 14-месечни рип плъхове.

## 4.2.3 Влияние на мелатониновия дефицит върху ефектите на фентанил

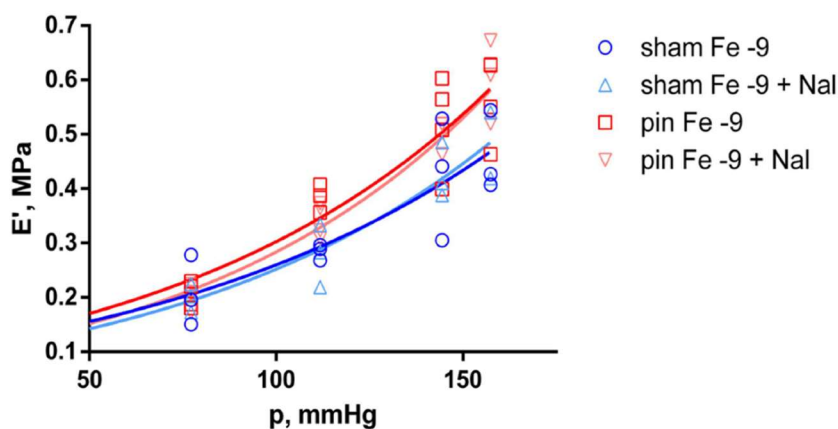
### 4.2.3.1 3-месечни плъхове

За да се изследват допълнително ефектите от дефицита на мелатонин бе направено сравнение на  $f_0$  и  $E'$  между sham и рип групите при всяка една концентрация на фентанил. Собствената честота, като линейна функция на еквивалентното кръвно налягане, е значително по-висока ( $p < 0,035$ ) в рип групата отколкото в sham групата само при най-ниската концентрация на фентанил ( $Fe\ 10^{-9}\ mol/L$ ). Разликата между двете групи нараства с повишаване на еквивалентното кръвно налягане. При същата концентрация на фентанил подобен резултат се наблюдава и за  $E'$  ( $p < 0,035$ ), докато по-високите концентрации не оказват значително въздействие върху двете вискозоеластични характеристики. С изключение на  $10^{-9}\ mol/L$ , по-високите концентрации на фентанил + налоксон  $10^{-6}\ mol/L$  не променят ефектите от пинеалектомията, тъй като  $f_0$  и  $E'$  отново са значително по-високи в сравнение със средните стойности в sham групата ( $f_0$ ,  $p < 0,035$ ;  $E'$ ,  $p < 0,015$ ). Наблюдаваните разлики при комбинацията с налоксон също се увеличават при по-високи нива на еквивалентно кръвно налягане, т.е.  $>111,8\ mmHg$  (Фигура 26 и Фигура 27).



Фигура 26. Собствена честота ( $f_0$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 3-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти между sham ( $n = 3$ ) и рип ( $n = 4$ ) групата при

еднакви концентрации на фентанил –  $10^{-9}$  фентанил (Fe-9) и  $10^{-9}$  фентанил +  $10^{-6}$  mol/L налоксон (Fe-9+Nal). Плътните линии показват най-подходящия регресионен модел (тъмносиня – sham група с Fe -9; светлосиня – sham група с Fe -9 + Nal; тъмно червена – pin група с Fe -9; светлочервена – pin група с Fe -9 + Nal).

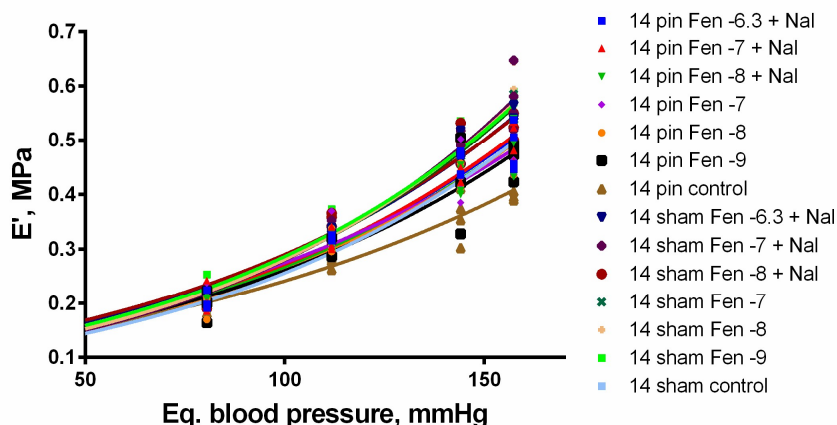


Фигура 27. Модул на еластичност ( $E'$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 3-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти между sham ( $n = 3$ ) и pin ( $n = 4$ ) групата при еднакви концентрации на фентанил –  $10^{-9}$  фентанил (Fe -9) и  $10^{-9}$  фентанил +  $10^{-6}$  mol/L налоксон (Fe -9 + Nal). Плътните криви показват най-подходящия регресионен модел (тъмносиня – sham група с Fe -9; светлосиня – sham група с Fe -9 + Nal; тъмночервена – pin група с Fe -9; светлочервена крива – pin група с Fe -9 + Nal).

С нарастване на концентрацията на фентанил, в sham групата средните стойности на  $f_0$  варират от 6,600-6,167 Hz при 80,5 mmHg до 6,733-6,667 Hz при 157,4 mmHg, а на  $E'$  – от 0,208-0,175 MPa при 80,5 mmHg до 0,459-0,456 MPa при 157,4 mmHg. В pin групата средните стойности на  $f_0$  варират от 6,725-6,625 Hz при 80,5 mmHg до 7,475-7,275 Hz при 157,4 mmHg, а на  $E'$  – от 0,204-0,201 MPa при 80,5 mmHg до 0,567-0,538 MPa при 157,4 mmHg.

#### 4.2.3.2 14-месечни плъхове

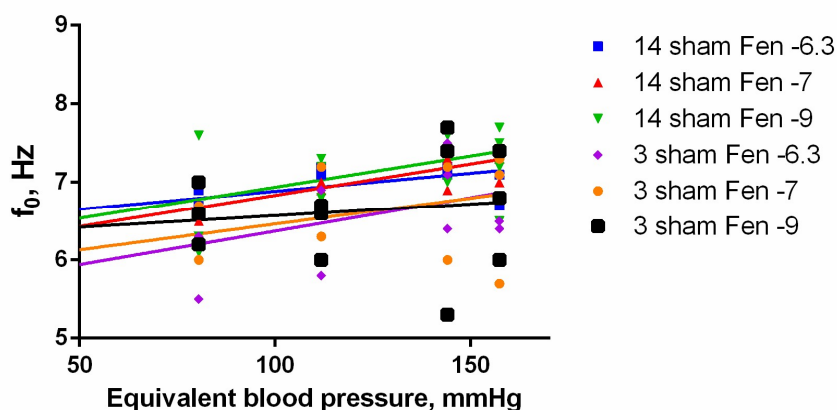
Вследствие на пинеалектомията и свързания с нея мелатонинов дефицит, в аортните препарати от 14-месечни плъхове бяха установени ефекти, частично противоположни на измерените при 3-месечните плъхове. Докато при  $f_0$  не бяха открити статистически значими разлики между регресионните прави, то при  $E'$  такива бяха отчетени при повечето изследвани концентрации на фентанил и фентанил +  $10^{-6}$  mol/L налоксон – при  $10^{-9}$  ( $p < 0,005$ ),  $10^{-8}$  ( $p < 0,005$ ),  $10^{-7}$  ( $p < 0,001$ ) mol/L фентанил и  $10^{-8}$  ( $p < 0,05$ ),  $10^{-7}$  ( $p < 0,005$ ),  $10^{-6,3}$  ( $p < 0,05$ ) mol/L фентанил +  $10^{-6}$  налоксон. При тези концентрации средните стойности на  $E'$  в pin групата на 14-месечните плъхове са значително понижени в сравнение с sham групата при същата възраст (Фигура 28). В sham групата средните стойности на  $E'$  варират от 0,206-0,216 MPa при 80,5 mmHg до 0,538-0,519 MPa при 157,4 mmHg. В pin групата средните стойности на  $E'$  варират от 0,197-0,203 MPa при 80,5 mmHg до 0,467-0,479 MPa при 157,4 mmHg.



Фигура 28. Модул на еластичност ( $E'$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 14-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти между sham ( $n = 4$ ) и pin ( $n = 4$ ) групата при еднакви концентрации на фентанил –  $10^{-9}$  фентанил (Fen -9),  $10^{-8}$  фентанил (Fen -8),  $10^{-7}$  фентанил (Fen -7) и  $10^{-8}$  фентанил +  $10^{-6}$  налоксон (Fe -8 + Nal),  $10^{-7}$  фентанил +  $10^{-6}$  налоксон (Fe -7 + Nal),  $10^{-6.3}$  фентанил +  $10^{-6}$  mol/L налоксон (Fe -6.3 + Nal). Плътните криви показват най-подходящия регресионен модел.

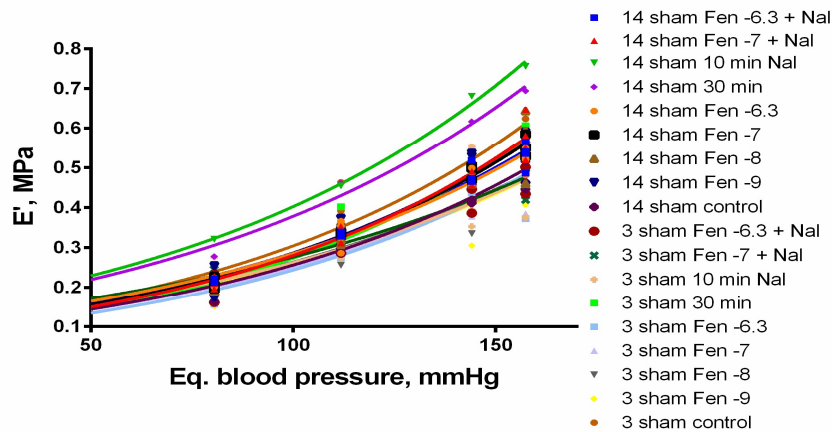
#### 4.2.4 Влияние на възрастта върху ефектите на фентанил

След сравнение на средните стойности на  $f_0$  и  $E'$  между групите аортни препарати, получени от 3-месечни и 14-месечни sham-оперирани плъхове, при еднакви концентрации на фентанил, бяха установени статистически значими разлики с еднопосочност на ефекта на възрастта, както при собствената честота, така и при модула на еластичност, а именно – повишение и на двете вискозоеластични характеристики при 14-месечните спрямо 3-месечните плъхове. За  $f_0$  разлики със значителен ефект са открити при три концентрации на фентанил –  $10^{-9}$  ( $p < 0,5$ ),  $10^{-7}$  ( $p < 0,05$ ) и  $10^{-6.3}$  ( $p < 0,01$ ) mol/L (Фигура 29). За  $E'$  разлики със значителен ефект са открити при почти всички концентрации на фентанил и фентанил +  $10^{-6}$  mol/L налоксон (Фигура 30), с изключение на  $10^{-9}$  mol/L фентанил  $10^{-6}$  mol/L налоксон (Fen -9 + Nal) и  $10^{-8}$  mol/L фентанил  $10^{-6}$  mol/L налоксон (Fen -8 + Nal).



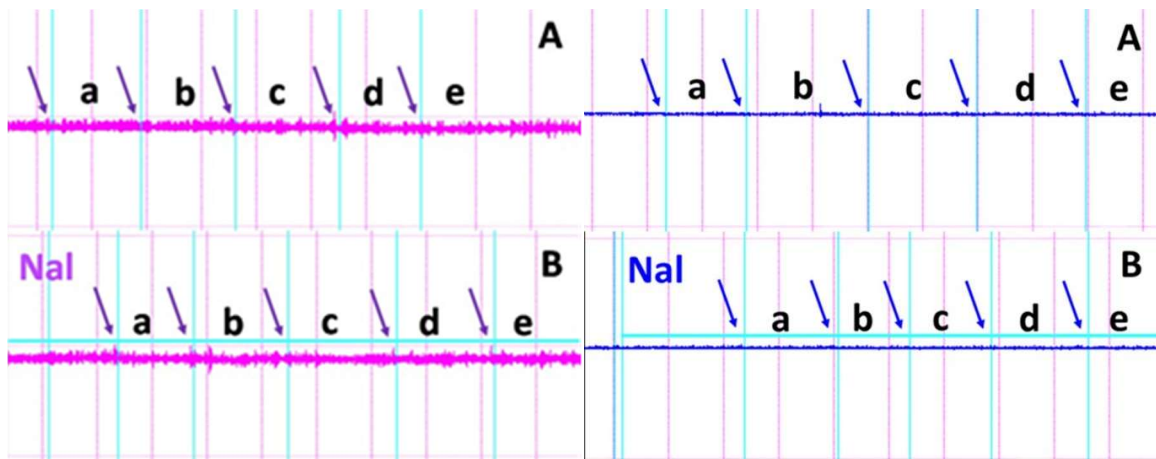
Фигура 29. Собствена честота ( $f_0$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при sham-оперирани плъхове. Сравнение на значителните ефекти между групите на 3-месечни ( $n = 3$ ) и 14-месечни ( $n = 4$ ) плъхове при еднакви концентрации на фентанил –  $10^{-9}$  фентанил (Fen -9),  $10^{-7}$  фентанил (Fen -7),  $10^{-6.3}$  mol/L фентанил (Fen -6,3). Плътните линии показват най-подходящия регресионен модел (тъмносивия – 14-месечни с Fen -6.3; червена – 14-месечни с Fen -7; зелена – 14-

месечни с Fen -9; лилава – 3-месечни с Fen -6.3; оранжева – 3-месечни с Fen -7; черна – 3-месечни с Fen -9).



Фигура 30. Модул на еластичност ( $E'$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при sham-оперираните плъхове. Сравнение на значителните ефекти между групите на 3-месечни ( $n = 3$ ) и 14-месечни ( $n = 4$ ) плъхове при еднакви концентрации на фентанил –  $10^{-9}$  фентанил (Fen -9),  $10^{-8}$  фентанил (Fen -8),  $10^{-7}$  фентанил (Fen -7),  $10^{-6.3}$  фентанил (Fen -6.3),  $10^{-7}$  фентанил +  $10^{-6}$  налоксон (Fen -7 + Nal),  $10^{-6.3}$  фентанил +  $10^{-6}$  mol/L налоксон (Fen -6.3 + Nal). Плътните криви показват най-подходящия регресионен модел.

Резултатите с метода за изследване на съкратителна активност показват (Фигура 31), че при напрежение от 2 g фентанил не повлиява тонуса на гладката мускулатура на аортните препарати, нито добавянето на  $10^{-6}$  mol/l налоксон. Спонтанния базален тонус на гладката мускулатура на аортните препарати остава непроменен по време на експериментите. Също така, не бяха наблюдавани съществени разлики между sham-оперирани и пинеалектомирани плъхове по отношение на съкратителната активност на аортните препарати.



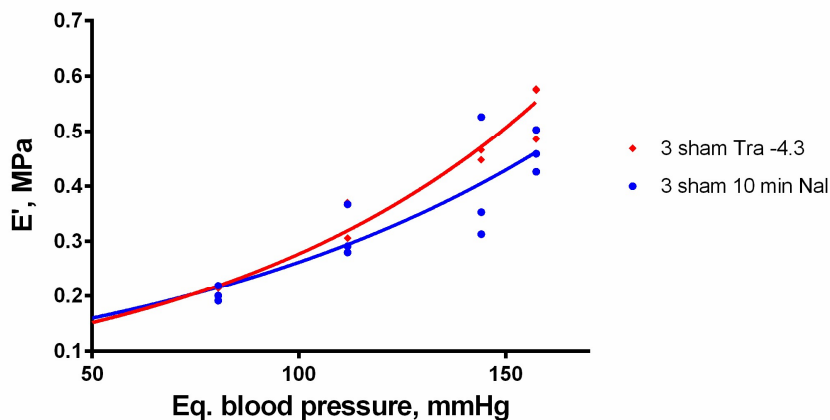
Фигура 31. Записи на тонуса на гладката мускулатура на аортни препарати от sham-оперирани (ляво, лилаво) и пинеалектомирани (дясно, синьо) плъхове. Стрелките показват мястото на кумулативно приложение на фентанил при пет нарастващи концентрации (от  $10^{-9}$  до  $10^{-5}$  M), обозначени с малки букви (от „a“ до „e“ съответно), в отсъствието („A“) и присъствието на  $10^{-6}$  M налоксон („B“), маркиран с хоризонтална светлосиня линия. Разликата в ширината на двата сигнала при sham-оперирани и пинеалектомирани плъхове се дължи на различната чувствителност на използваните трансдюсери.

## 4.3 Трамадол

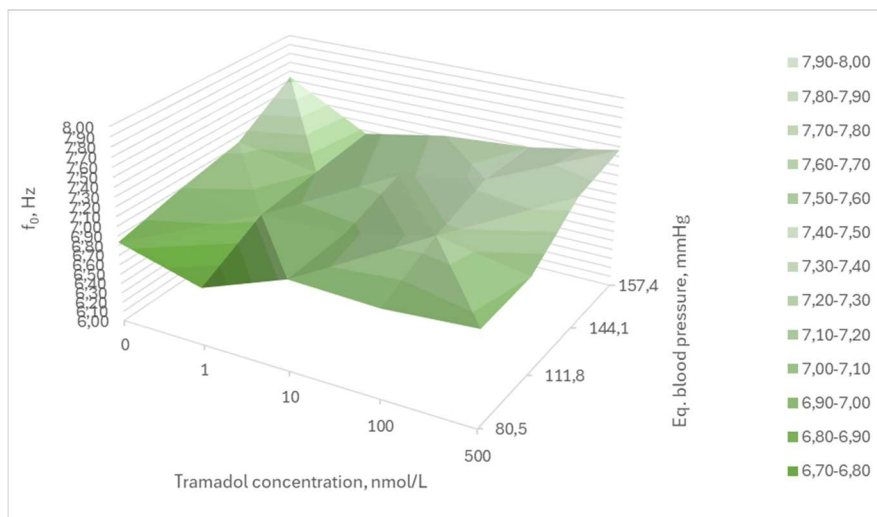
### 4.3.1 Ефекти на трамадол в sham групата

#### 4.3.1.1 3-месечни плъхове

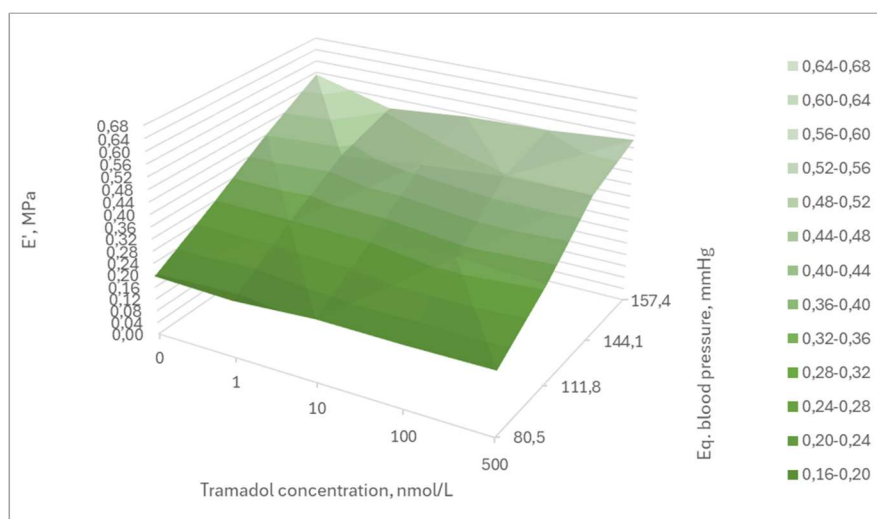
В групата на 3-месечните, sham-оперирани плъхове бе установено, че въздействието с кумулативно нарастващи концентрации трамадол ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ , и  $5 \times 10^{-5}$  mol/L) води до статистически значими промени само в  $E'$ , но не и в  $f_0$  за изследваните аортни препарати. Модулът на еластичност е значително променен единствено при сравнение между стойностите с най-високата концентрация трамадол ( $10^{-4.3}$  mol/L) и след 10 минутната перфузия с  $10^{-6}$  mol/L налоксон ( $p < 0,05$ ), при това  $E'$  е значително по-нисък след прилагане на налоксон. Статистически значими разлики в средните стойности между отделните концентрации трамадол не бяха установени. Подобно на установеното в контролните измервания, в присъствие на трамадол също се открива експоненциално нарастване на модула на еластичност на препаратите с увеличаване на еквивалентното артериално кръвно налягане (Фигура 32). Графики на зависимостта концентрация-ефект, съответно за  $f_0$  и  $E'$ , са представени на Фигура 33 и Фигура 34 като 3D графики на повърхност (т.нар. surface plot), показващи зависимостта на всяка вискозоеластична характеристика едновременно от еквивалентното кръвно налягане и концентрацията на трамадол.



Фигура 32. Модул на еластичност ( $E'$ ) в зависимост от еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 3-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти в рамките на sham групата ( $n = 3$ ) с измервания направени след  $10^{-4.3}$  mol/L трамадол (Tra -4.3) и 10 min  $10^{-6}$  mol/L налоксон (10 min Nal). Плътните криви показват най-подходящия регресионен модел (червена –  $10^{-4.3}$  mol/L трамадол; синя –  $10^{-6}$  mol/L налоксон).



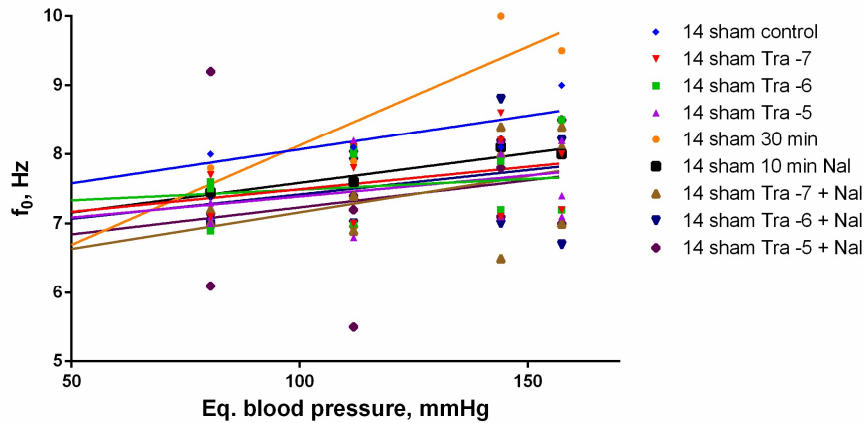
**Фигура 33.** Surface plot на собствената честота ( $f_0$ ) в зависимост от концентрацията на трамадол и еквивалентното кръвно налягане при 3-месечни sham пълхове.



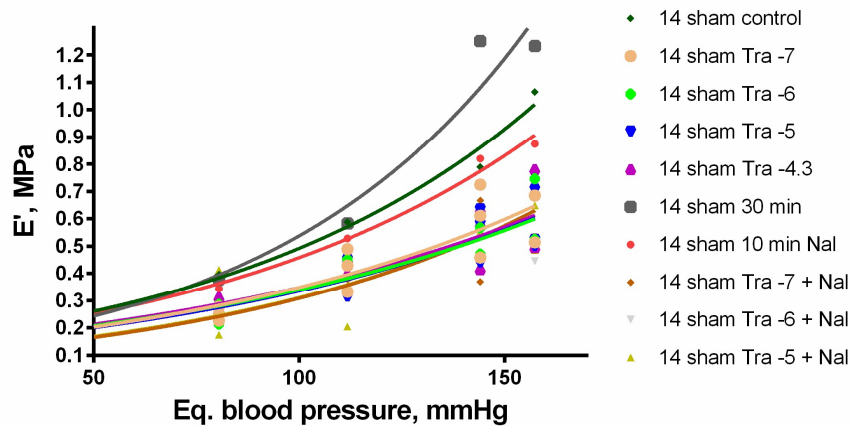
**Фигура 34.** Surface plot на модула на еластичност ( $E'$ ) в зависимост от концентрацията на трамадол и еквивалентното кръвно налягане при 3-месечни sham пълхове.

#### 4.3.1.2 14-месечни пълхове

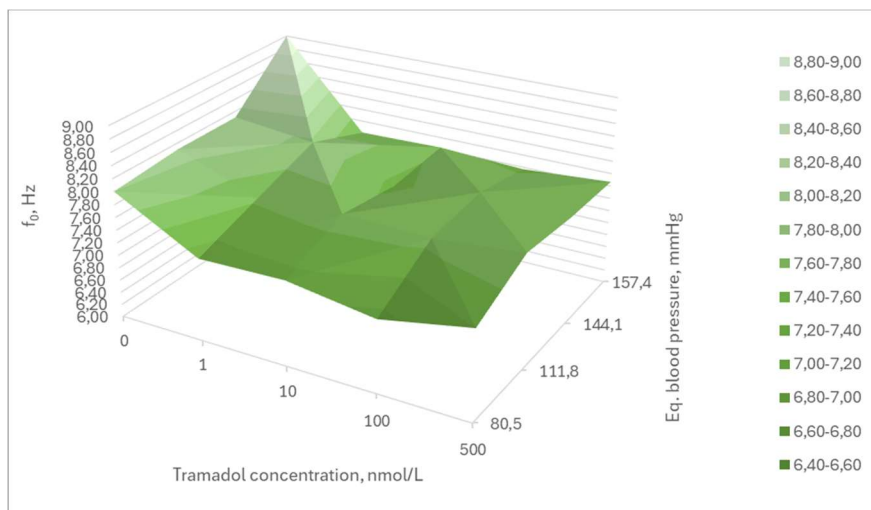
Спрямо контролното измерване в групата на 14-месечните, sham-оперирани пълхове въздействието с всички изследвани концентрации трамадол и трамадол +  $10^{-6}$  mol/L налоксон води до значително понижение както на собствената честота (Фигура 35), така и на модула на еластичност (Фигура 36) на препаратите. Ефекти с подобна посока и статистическа значимост бяха установени също и спрямо средните стойности, отчетени след 30 минути перфузия с чист хранителен разтвор и след 10 минути перфузия с  $10^{-6}$  mol/L разтвор на налоксон, а именно понижение на  $f_0$  и  $E'$  с всички прилагани концентрации трамадол. Откритите разлики при  $E'$  са с по-висока достоверност ( $p < 0,005$ ), отколкото при  $f_0$  ( $p < 0,05$ ). Статистически значими разлики в средните стойности между отделните концентрации трамадол не бяха установени. Графики на зависимостта концентрация-ефект, съответно за  $f_0$  и  $E'$ , са представени на Фигура 37 и Фигура 38 като 3D графики на повърхност (т.нар. surface plot), показващи зависимостта на всяка вискозоеластична характеристика едновременно от еквивалентното кръвно налягане и концентрацията на трамадол.



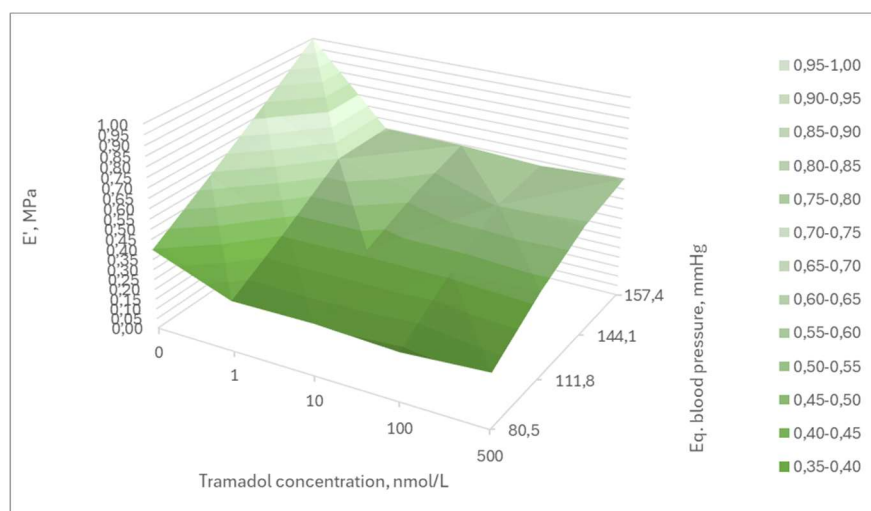
Фигура 35. Собствена честота ( $f_0$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 14-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти в рамките на sham групата ( $n = 3$ ) с измервания направени след контролното измерване, трамадол  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  и  $10^{-5}$ , след 30 минутна перфузия с чист хранителен разтвор, след 10 минутна перфузия с  $10^{-6}$  налоксон, както и след  $10^{-7}$  трамадол + налоксон,  $10^{-6}$  + налоксон,  $10^{-5}$  mol/L + налоксон. Плътните линии показват най-подходящия регресионен модел (синя – контролно измерване; червена -  $10^{-7}$  трамадол; зелена -  $10^{-6}$  трамадол; лилава -  $10^{-5}$  трамадол; оранжева – след 30 мин перфузия; черна – след 10 мин перфузия с  $10^{-6}$  налоксон; кафява -  $10^{-7}$  трамадол +  $10^{-6}$  налоксон; тъмносива -  $10^{-6}$  трамадол +  $10^{-6}$  налоксон; пурпурна -  $10^{-5}$  трамадол +  $10^{-6}$  mol/L налоксон).



Фигура 36. Модул на еластичност ( $E'$ ) в зависимост от еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 14-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти в рамките на sham групата ( $n = 3$ ) с измервания направени след контролното измерване,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-4.3}$  трамадол, след 30 минутна перфузия с чист хранителен разтвор, след 10 минутна перфузия с  $10^{-6}$  налоксон, както и след трамадол  $10^{-7}$  + налоксон,  $10^{-6}$  + налоксон,  $10^{-5}$  mol/L + налоксон. Плътните криви показват най-подходящия регресионен модел (тъмнозелена – контролно измерване; бежова -  $10^{-7}$  трамадол; зелена -  $10^{-6}$  трамадол; синя -  $10^{-5}$  трамадол; лилава –  $10^{-4.3}$  трамадол; тъмносива – след 30 мин перфузия; розова – след 10 мин перфузия с  $10^{-6}$  налоксон; кафява -  $10^{-7}$  трамадол +  $10^{-6}$  налоксон; сива –  $10^{-6}$  трамадол +  $10^{-6}$  налоксон; жълтозелена -  $10^{-5}$  трамадол +  $10^{-6}$  mol/L налоксон).



Фигура 37. Surface plot на собствената честота ( $f_0$ ) в зависимост от концентрацията на трамадол и еквивалентното кръвно налягане при 14-месечни sham плъхове.

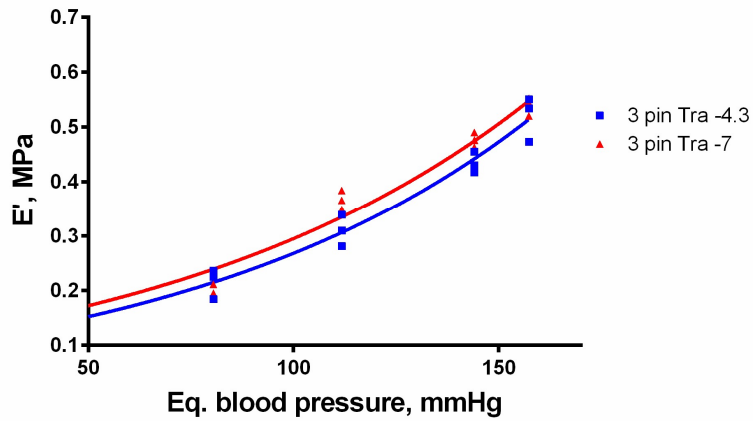


Фигура 38. Surface plot на модула на еластичност ( $E'$ ) в зависимост от концентрацията на трамадол и екв. кръвно налягане при 14-месечни sham плъхове.

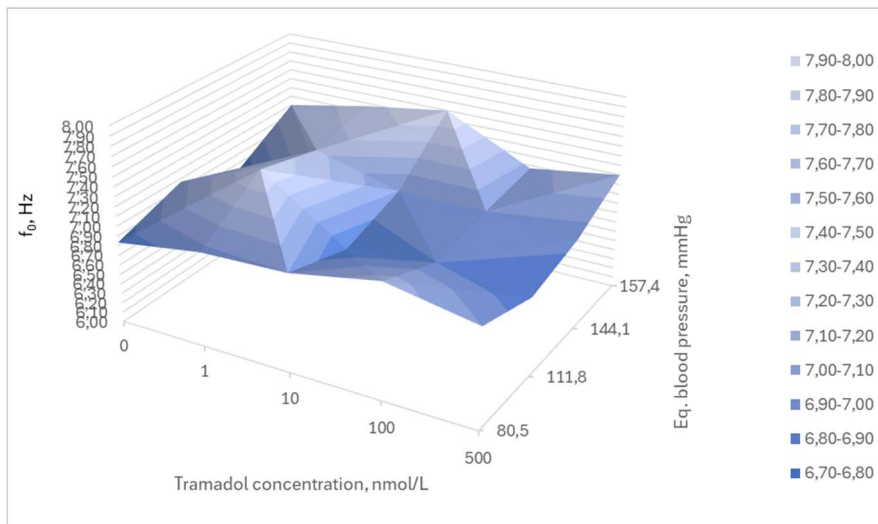
### 4.3.2 Ефекти на трамадол в рип групата

#### 4.3.2.1 3-месечни плъхове

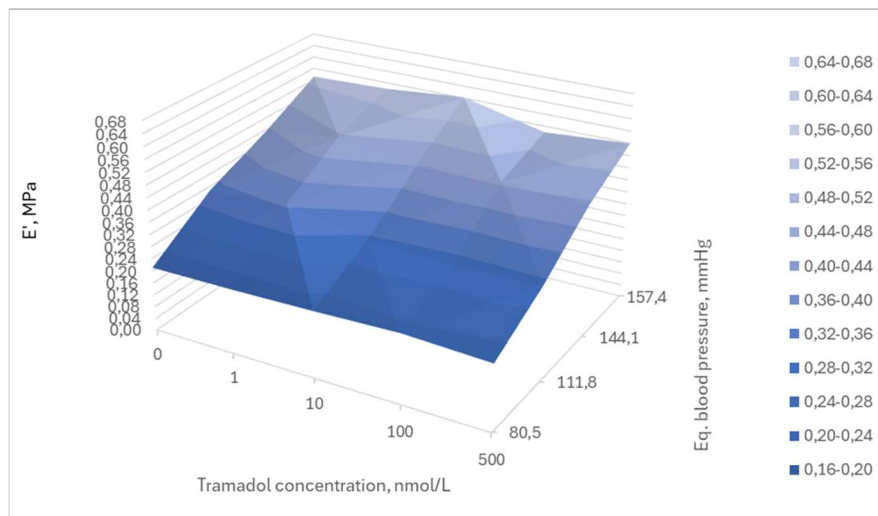
В групата на 3-месечните, sham-оперирани плъхове бе установено, че въздействието с кумулативно нарастващи концентрации на трамадол и трамадол +  $10^{-6}$  mol/L налоксон не променя значително средните стойности на  $f_0$  и  $E'$  спрямо контролните, но въпреки това статистически значимо понижение на модула на еластичност (Фигура 39) бе открито при най-високата концентрация трамадол ( $10^{-4,3}$  mol/L) в сравнение с най-ниската –  $10^{-7}$  mol/L ( $p < 0,05$ ). Понижение на  $E'$  спрямо най-ниската концентрация, но с гранична значимост бе установено също и след перфузия на препаратите с  $10^{-5}$  mol/L трамадол ( $p = 0,0579$ ). Графики на зависимостта концентрация-ефект, съответно за  $f_0$  и  $E'$ , са представени на Фигура 40 и Фигура 41 като 3D графики на повърхност (т.нар. surface plot), показващи зависимостта на всяка вискозоеластична характеристика едновременно от еквивалентното кръвно налягане и концентрацията на трамадол.



Фигура 39. Модул на еластичност ( $E'$ ) в зависимост от еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 3-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти в рамките на  $pin$  групата ( $n = 3$ ) с измервания направени след трамадол  $10^{-7}$  (Tra -4.3) и  $10^{-4.3}$  (Tra -7) mol/L. Плътните криви показват най-подходящия регресионен модел (синя –  $10^{-7}$  трамадол; червена –  $10^{-4.3}$  mol/L трамадол).



Фигура 40. Surface plot на собствената честота ( $f_0$ ) в зависимост от концентрацията на трамадол и еквивалентното кръвно налягане при 3-месечни  $pin$  плъхове.



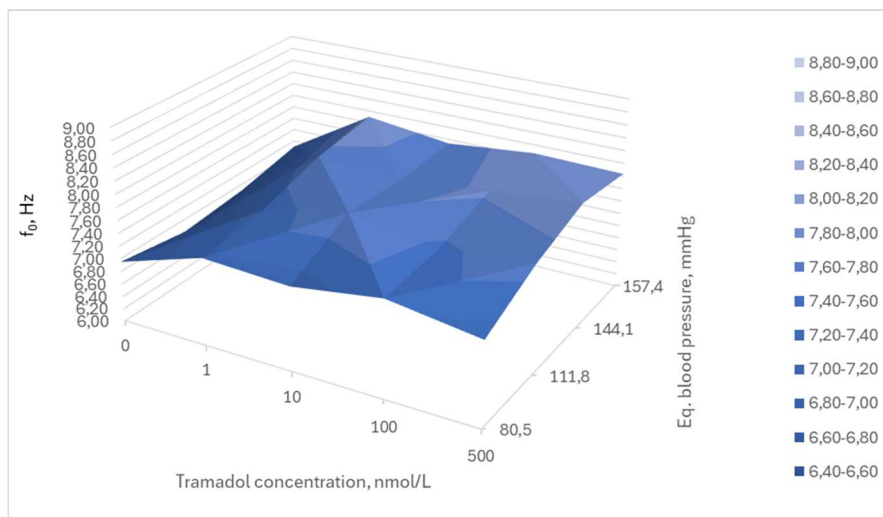
Фигура 41. Surface plot на модула на еластичност ( $E'$ ) в зависимост от концентрацията на трамадол и еквивалентното кръвно налягане при 3-месечни  $pin$  плъхове.

#### 4.3.2.2 14-месечни пълхове

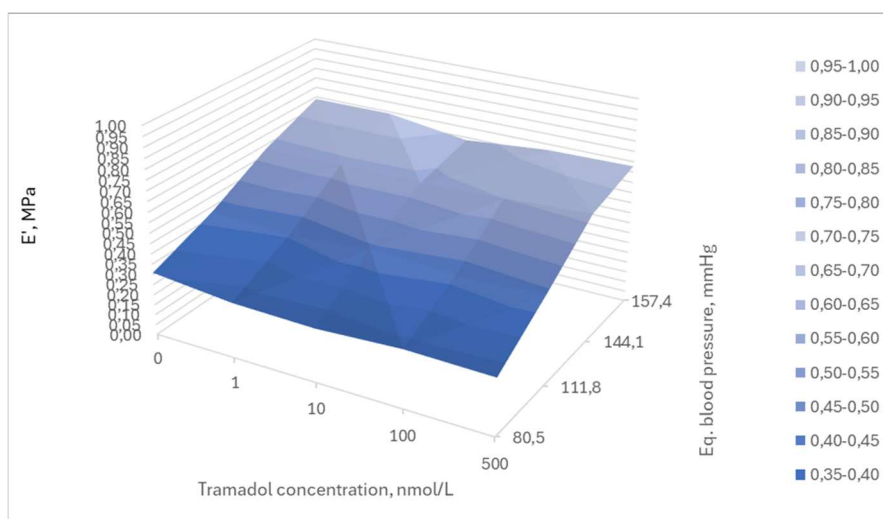
Спрямо контролното измерване в групата на 14-месечните, пинеалектомирани (pin) пълхове въздействието с почти всички изследвани концентрации трамадол и трамадол +  $10^{-6}$  mol/L налоксон води до значително повишение на  $f_0$  в изследваните аортни препарати. Трябва да се отбележи, че при две от концентрациите на трамадол ( $10^{-6}$  и  $10^{-5}$  mol/L) повишението на  $f_0$  спрямо контролното измерване е с гранична значимост (съответно  $p = 0,062$  и  $0,065$ ). Същевременно при  $E'$  не бяха отчетени статистически значими разлики след прилагане на кумулативно нарастващи концентрации трамадол спрямо контролното измерване, проведено след първоначалното адаптиране на препаратите. Графики на зависимостта концентрация-ефект, съответно за  $f_0$  и  $E'$ , са представени на Фигура 43 и Фигура 44 като 3D графики на повърхност (т.нар. surface plot), показващи зависимостта на всяка вискозоеластична характеристика едновременно от еквивалентното кръвно налягане и концентрацията на трамадол.



Фигура 42. Собствена честота ( $f_0$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 14-месечни пълхове. Сравнение на значителните ефекти в рамките на pin групата ( $n = 3$ ) с измервания направени след контрола, трамадол  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-4,3}$  mol/L, както и след трамадол  $10^{-7}$  + налоксон,  $10^{-6}$  + налоксон,  $10^{-5}$  mol/L + налоксон. Пълтните линии показват най-подходящия регресионен модел (синя – контролно измерване; червена – трамадол  $10^{-7}$ ; лилава – трамадол  $10^{-5}$ ; оранжева – трамадол  $10^{-4,3}$ ; тъмносиня – трамадол  $10^{-7}$  + налоксон; пурпурна – трамадол  $10^{-6}$  + налоксон; кафява – трамадол  $10^{-5}$  mol/L + налоксон)



**Фигура 43. Surface plot на собствената честота ( $f_0$ ) в зависимост от концентрацията на трамадол и еквивалентното кръвно налягане при 14-месечни рип плъхове.**

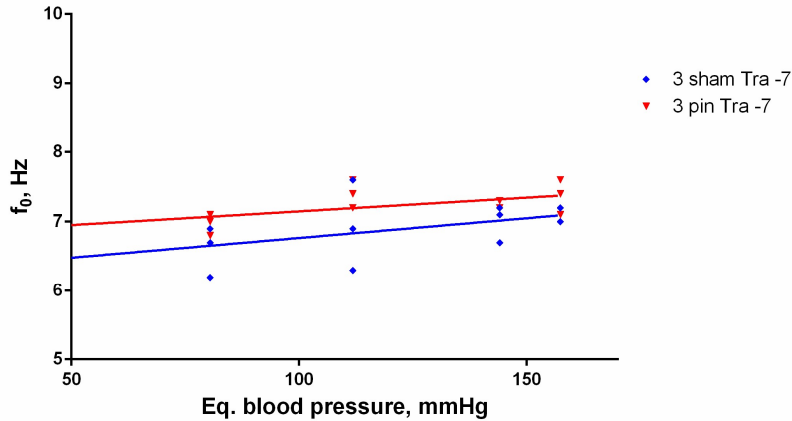


**Фигура 44. Surface plot на модула на еластичност ( $E'$ ) в зависимост от концентрацията на трамадол и еквивалентното кръвно налягане при 14-месечни рип плъхове.**

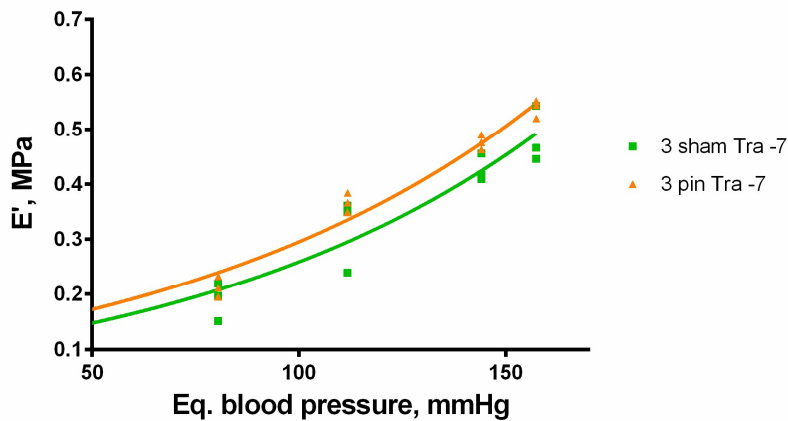
### 4.3.3 Влияние на мелатониновия дефицит върху ефектите на трамадол

#### 4.3.3.1 3-месечни плъхове

За да се изследват допълнително ефектите от дефицита на мелатонин бе направено сравнение на  $f_0$  и  $E'$  между sham и рип групите при всяка една концентрация на фентанил. Подобно на резултатите от експериментите с фентанил собствената честота, като линейна функция на еквивалентното кръвно налягане, бе определена като значително по-висока ( $p < 0,01$ ) в рип групата отколкото в sham групата само при най-ниската концентрация на трамадол ( $\text{Tra } 10^{-7} \text{ mol/L}$ ). Обратно на наблюдавания ефект на фентанил, след третиране с трамадол разликата между двете групи не нараства, а се запазва относително постоянна с повишаване на еквивалентното кръвно налягане (Фигура 45). При същата концентрация на трамадол подобен резултат се наблюдава и за  $E'$  ( $p < 0,05$ ), а по-високите концентрации не оказват значително въздействие върху двете вискозоеластични характеристики (Фигура 46).



Фигура 45. Собствена честота ( $f_0$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 3-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти между sham ( $n = 3$ ) и pin ( $n = 3$ ) групата при еднакви концентрации на трамадол –  $10^{-7}$  mol/L трамадол (Tra -7). Плътните линии показват най-подходящия регресионен модел (синя – sham група с Tra -7; червена – pin група с Tra -7).



Фигура 46. Модул на еластичност ( $E'$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при 3-месечни плъхове. Сравнение на значителните ефекти между sham ( $n = 3$ ) и pin ( $n = 3$ ) групата при еднакви концентрации на трамадол –  $10^{-7}$  mol/L трамадол (Tra -7). Плътните криви показват най-подходящия регресионен модел (зелена – sham група с Tra -7; оранжева – pin група с Tra -7).

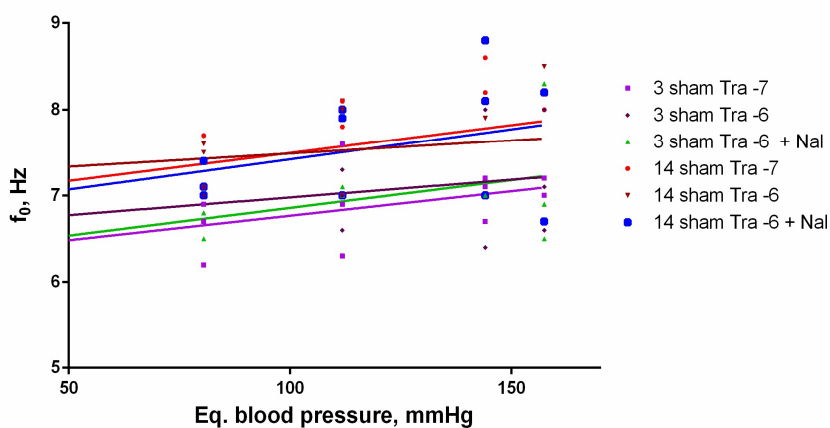
С нарастване на концентрацията на трамадол, в sham групата средните стойности на  $f_0$  варират от 6,600-6,967 Hz при 80,5 mmHg до 7,067-7,467 Hz при 157,4 mmHg, а на  $E'$  – от 0,189-0,209 MPa при 80,5 mmHg до 0,485-0,546 MPa при 157,4 mmHg. В pin групата средните стойности на  $f_0$  варират от 6,967-7,000 Hz при 80,5 mmHg до 7,367-7,200 Hz при 157,4 mmHg, а на  $E'$  – от 0,213-0,215 MPa при 80,5 mmHg до 0,539-0,519 MPa при 157,4 mmHg.

#### 4.3.3.2 14-месечни плъхове

При аортните препарати от 14-месечни плъхове не бяха установени статистически значими разлики между регресионните модели за  $f_0$  и  $E'$  в присъствие на трамадол, с нарастващи концентрации от  $10^{-7}$  до  $5 \times 10^{-5}$  mol/L. С нарастване на концентрацията на трамадол, в sham групата средните стойности на  $f_0$  варират от 7,300-7,400 Hz при 80,5 mmHg до 7,600-7,667 Hz при 157,4 mmHg, а на  $E'$  – от 0,252-0,267 MPa при 80,5 mmHg до 0,600-0,603 MPa при 157,4 mmHg. В pin групата средните стойности на  $f_0$  варират от 7,367-7,300 Hz при 80,5 mmHg до 7,900-7,803 Hz при 157,4 mmHg, а на  $E'$  – от 0,269-0,272 MPa при 80,5 mmHg до 0,691-0,678 MPa при 157,4 mmHg.

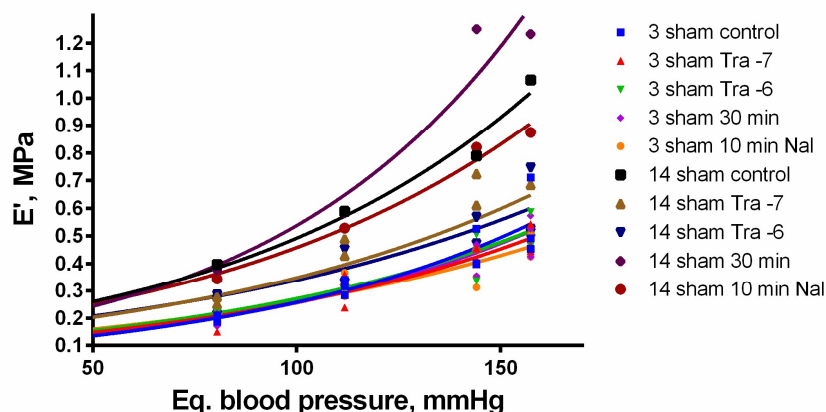
#### 4.3.4 Влияние на възрастта върху ефектите на трамадол

След сравнение на средните стойности на  $f_0$  и  $E'$  между групите аортни препарати, получени от 3-месечни и 14-месечни sham-оперирани плъхове и обливани с разтвори на трамадол и трамадол + налоксон, бе открито повишение на двете вискозоеластични характеристики с нарастване на възрастта. Само при някои от изследваните концентрации на трамадол бяха установени статистически значими разлики при модула на еластичност и собствената честота.  $f_0$  е значително повишена в препарати от 14-месечни плъхове (Фигура 47), обливани с разтвори на трамадол при концентрация  $10^{-7}$  ( $p < 0,001$ ) и  $10^{-6}$  mol/L ( $p < 0,05$ ), както и с комбинация на  $10^{-6}$  mol/L трамадол +  $10^{-6}$  mol/L налоксон ( $p < 0,05$ ).



Фигура 47. Собствена честота ( $f_0$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при sham-оперираните плъхове. Сравнение на значителните ефекти между групите на 3-месечни ( $n = 3$ ) и 14-месечни ( $n = 3$ ) плъхове при еднакви концентрации на трамадол –  $10^{-7}$  трамадол (Tra -7),  $10^{-6}$  трамадол (Tra -6) и  $10^{-6}$  трамадол +  $10^{-6}$  mol/L налоксон (Tra -6 + Nal). Плътните линии показват най-подходящия регресионен модел (лилава – 3-месечни с Tra -7; тъмнолилава – 3-месечни с Tra -6; зелена – 3-месечни с Tra -6 + Nal; червена – 14-месечни с Tra -7; кафява – 14-месечни с Tra -6; синя – 14-месечни с Tra -6 + Nal).

При  $E'$  също бе установено повишение при 14-месечните спрямо 3-месечните плъхове след перфузия с разтвори съдържащи  $10^{-7}$  ( $p < 0,005$ ) и  $10^{-6}$  ( $p = 0,0565^*$ ) mol/L трамадол, но и след 30-минутна перфузия с чист хранителен разтвор ( $p < 0,0001$ ), както и след 10-минутна перфузия с  $10^{-6}$  mol/L разтвор на налоксон ( $p < 0,0001$ ). Резултата с  $10^{-6}$  mol/L трамадол е с гранична значимост  $p \approx 0,0565$  (Фигура 48).



Фигура 48. Модул на еластичност ( $E'$ ) като функция на еквивалентното кръвно налягане ( $p$ ) при sham-оперираните плъхове. Сравнение на значителните ефекти между групите на 3-месечни ( $n = 3$ ) и 14-месечни ( $n = 3$ ) плъхове при еднакви концентрации на трамадол –  $10^{-7}$  трамадол (Tra -7),  $10^{-6}$  mol/L трамадол (Tra -6), както и след контролно измерване, 30 минути перфузия с хран. разтвор (30 min) и след 10 минути перфузия с  $10^{-6}$  mol/L налоксон (10 min Nal). Плътните криви показват най-подходящия регресионен модел (синя – 3-месечни контрола; червена – 3-месечни с Tra -7; зелена – 3-месечни с Tra -6; лилава – 3-месечни след 30 мин перфузия; оранжева – 3-месечни след 10 min налоксон; черна – 14-месечни контрола; кафява – 14-месечни Tra -7; тъмносива – 14-месечни Tra -6; тъмнолилава – 14-месечни след 30 мин перфузия; пурпурна – 14-месечни след 10 min налоксон).

Подобно на резултатите с фентанил, по метода за изследване на съкратителна активност, при напрежение от 2 g трамадол не повлиява тонуса на гладката мускулатура на аортните препарати, нито добавянето на  $10^{-6}$  mol/l налоксон. Спонтанния базален тонус на гладката мускулатура на аортните препарати остава непроменен по време на експериментите. Също така, не бяха наблюдавани съществени разлики между sham-оперирани и пинеалектомирани плъхове по отношение на съкратителната активност на аортните препарати.

## 5. Дискусия

### 5.1 Влияние на възрастта

Въпреки, че в по-ранния анализ, проведен с по-малка извадка нетретирани аортни препарати (от неоперирани, 3- и 14-месечни плъхове), двете вискозоеластични характеристики  $f_0$  и  $E'$  бяха със значително понижени стойности при по-възрастните животни, последващия анализ с по-голяма извадка sham-оперирани плъхове показва, че между 3- и 14-месечни животни няма статистически значими разлики в средните стойности на  $f_0$  и  $E'$ , докато при 18-месечните се открива значителен спад само в една от двете вискозоеластични характеристики – модула на еластичност. В нетретирани с вещества аортни препарати, единствено в  $E'$  на 18-месечните плъхове се открива намаление както при сравнение с 3-месечни ( $p < 0,001$ ), така и с 14-месечни ( $p < 0,01$ ) животни. Възможно е получените резултати с препаратите от 3- и 14-месечни животни да се дължат на сравнително малкия размер на статистическата извадка, при първоначалното сравнение и/или на значително въздействие на sham-операцията върху физиологичните показатели, отсъстващо в здравите, неоперирани плъхове от по-ранния анализ.

При отчитане на по-малкия размер на извадката от изследвани препарати от 3- и 14-месечни плъхове, би могло да се направи заключение, че не е открита значителна промяна в коефициента на вискозни загуби ( $\beta$ ) с напредване на възрастта. Това е в противоречие с резултатите от предишни констатации на Antonov et al. за по-високи стойности във възрастовата група на 14-месечните плъхове, но също така трябва да се отбележи, че цитираните изследвания са проведени върху цилиндрични сегменти от аортната стена.

В третирани аортни препарати, получени от 3-месечни и 14-месечни sham-оперирани плъхове, при еднакви концентрации на фентанил бяха установени статистически значително по-високи  $f_0$  и  $E'$  при 14-месечните спрямо 3-месечните плъхове. В аортните препарати, обливани с разтвори на трамадол и трамадол + налоксон, също бяха открити по-високи средни стойности на двете вискозоеластични характеристики при по-възрастните животни. Получените резултати за третирани и нетретирани препарати показват значителна разлика във влиянието на възрастта и насочват към допускането за общ механизъм на действие на приложените две лекарствени вещества. Независимо от останалите фактори, във всички възрасти на sham и pin групите се наблюдава тенденция за увеличение на  $f_0$  и  $E'$  с повишаване на еквивалентното артериално кръвно налягане, в най-ниска степен това влияние на възрастта е застъпено за  $E'$  в sham групата на аортни препарати от 18-месечни плъхове, както и за  $f_0$  в pin групата 14-месечни плъхове.

Трябва да се има предвид също, че *in vitro* изследванията с тъканни препарати *post mortem* могат да предоставят полезна информация само при сравнение помежду си, но не могат да се използват като мярка за еластичността *in vivo*. Въпреки това, представените изследвания най-много се доближават до действителните стойности на вискозоеластичните характеристики *in vivo*, предвид запазената виталност на препаратите, в сравнение с литературните данни за препарати, изследвани часове след смъртта.

## 5.2 Влияние на мелатониновия дефицит

В нетретирани аортни препарати,  $f_0$  е статистически значително изменена само за 18-месечните плъхове, при които средните стойности са по-ниски в групата на пинеалектомираните отколкото в тази на sham-оперираниите.  $E'$  също е значително по-нисък в pin групата не само при 18-месечните плъхове, но и при 3-месечните. За двете вискозоеластични характеристики не бяха установени значителни разлики между sham и pin групите в препарати от 14-месечни плъхове в отсъствие на вещества. За разлика от понижението, отчетено в нетретираниите с вещества препарати, в присъствие на фентанил аортните препарати от 3-месечни плъхове показват значително по-високи  $f_0$  и  $E'$  в групата на пинеалектомираните отколкото при претърпелите sham-операция. Интересна особеност е, че при третирани с фентанил препарати от 14-месечни плъхове само  $E'$ , но не и  $f_0$ , е значително различен, при това в обратна посока на ефекта, отчетен при 3-месечните плъхове и подобен на този в нетретираниите с вещества, а именно по-ниски средни стойности в групата на пинеалектомираните животни. В присъствие на трамадол, за разлика от понижението в нетретираниите с вещества препарати,  $f_0$  и  $E'$  са значително по-високи в препаратите от пинеалектомирани 3-месечни плъхове. За двете вискозоеластични характеристики не бяха установени значителни разлики между sham и pin групите, в препарати от 14-месечни плъхове, третирани с трамадол.

Тези резултати дават основание за предположение, че във възрастовата група на 14-месечните Wistar плъхове дефицитът на мелатонин сам по себе си не променя стойностите на вискозоеластичните характеристики, а оттам и разтегливостта на аортната стена. Липсата на статистическа значимост за  $f_0$  при 3-месечните плъхове вероятно се дължи на малкия размер на извадката, поради което липсата на ефект от пинеалектомията трябва да бъде допълнително разгледана в изследване, включващо по-голям брой експериментални животни. Въпреки това, при сравнение на двете групи (sham и pin) 3-месечни плъхове в присъствието на фентанил и трамадол, стойностите на собствената честота и модула на еластичност остават по-високи в pin групата, дори след понижението, предизвикано от собствения ефект на фентанил. Вземайки предвид, че фентанил понижава както собствената честота, така и артериалната твърдост в sham и pin групите препарати от 3-месечни плъхове, както и че мелатониновия недостиг от една страна самостоятелно също понижава артериалната твърдост, а от друга в присъствие на фентанил привидно повишава двете вискозоеластични характеристики, но недостатъчно за възстановяването му до контролното ниво, това би могло да се тълкува като по-слаб понижаващ ефект на фентанил върху двете характеристики в условия на мелатонинов дефицит (pin група).

Повишената твърдост на аортната стена в pin групата (в присъствие на фентанил и трамадол) е в съответствие с очакваното фиброзно ремоделиране на стената, вследствие на индуциран от пинеалектомията дефицит на мелатонин. Промяната в структурата на аортната стена се свързва с повишаване на съдържанието на колаген тип I и III, както и оксидативен стрес в tunica media, според данни на Repová-Bednářová et al. и Simko et al., получени с модел на мелатонинов дефицит при плъх с непрекъснато излагане на светлина. Същите автори показват, че пероралното прилагане *in vivo* на екзогенен мелатонин оказва антифиброзен ефект и намалява ефектите от дисфункцията на пинеалната жлеза, предизвикана от няколкоседмичното 24-часово излагане на светлина, поради което се приема, че повишаването на твърдостта на аортната стена се дължи на фотофаза-индуциран мелатонинов дефицит. На основата на заключенията на Repová-Bednářová et al. и Simko et al. би могло да се допусне, че собствените резултати ги подкрепят, тъй като показват, че моделът на мелатонинов дефицит с извършване на пинеалектомия също може да доведе до повишена твърдост (т.е. намалена разтегливост) на аортната стена при 3-месечни плъхове, но само в присъствие на фентанил или трамадол.

Обратно, в отсъствие на вещества собствените резултати показват, че понижената твърдост на аортната стена в pin групата е в противоречие с установеното фиброзно ремоделиране на стената, описано в литературата при модел с непрекъснато излагане на светлина. В изследване на Molnar et al. е установено, че в аортни пръстени със запазен ендотел и премахната PVAT, получени от мъжки Sprague-Dawley плъхове, кортикостерон приложен в концентрации над  $10^{-9}$  mol/l ( $> 0,346$  ng/ml) е достатъчен да повиши фенилефрин-индуцираното съкращение на ГМК, но същият ефект не е отчетен при премахнат ендотелен слой. Това означава, че важен фактор, който трябва да бъде отчетен при сравнение с други изследвания, използващи модел на мелатонинов дефицит с постоянно излагане към светлина е, че в собствените резултати вискозоеластичните характеристики са измерени при премахнат ендотелен слой, който в изследванията на Repová-Bednářová et al. и Simko et al. остава незасегнат.

Трябва да се отбележи също, че плъховете Wistar са нощни животни, но не всички видове от разред гризачи (*Rodentia*) са активни през нощта, като например бандикотът (*Bandicota bengalensis*), обикновената (сива) полевка (*Microtus arvalis*), полската мишка

(*Apodemus agrarius*), род африкански тревни мишки (*Arvicanthis*: *A. niloticus* и *A. ansorgei*) и белоопашатата антилопова катерица (*Ammospermophilus leucurus*), които са с изразена дневна активност (Refinetti et al., 2018). Според Ishida et al. активацията на SCN чрез симпатикови неврони води до повишена генна експресия в надбъбречната жлеза, съответно повишаване и на нивата на кортикостерон в плазмата и мозъка на мишки без съпътстваща активация на оста хипоталамус-аденохипофиза. В сравнително изследване между Wistar плъхове и *Arvicanthis ansorgei*, Kalsbeek et al. установяват, че активирането на хипоталамо-хипофизо-адреналната (HPA) ос от SCN се извършва с посредничеството на вазопресин-медирана (VP) стимулация от PVN неврони. При нощни животни като Wistar плъхове, VP има потискащ ефект върху освобождаването на кортикостерон. Обратно на наблюденията при плъхове, VP в хипоталамусното паравентрикуларно ядро на дневни животни като *A. ansorgei* има стимулиращ ефект върху освобождаването на кортикостерон. Тези резултати показват, че по отношение на циркадианния контрол на секрецията на кортикостерон при дневни и нощни гризачи, времевата информация се пренася по същия път от SCN до целевите неврони, но при това крайният отговор е различен. Предполага се, че обратният отговор към VP се дължи на промяна във фенотипа на целевите неврони, които са в контакт с SCN еференти, т.е. използване на глутаматергична вместо ГАМК-ергична невротрансмисия. Изследвания на Droste et al. показват, че при запазен режим светлина-тъмнина концентрацията на кортикостерон в хипокампуса, както на мъжки, така и на женски Wistar плъхове достига своята върхова средна стойност ( $\approx 2,2$  ng/ml) в ранните часове (19-21 ч.) на тъмната част от денонощието.

Според изследване на Milosevic et al., ефектите от хронично излагане към светлина върху *zona fasciculata* на надбъбречните жлези при възрастни, женски Wistar плъхове включват както значително нарастване на нейния обем, така и повишение с 13% на средната стойност на серумната концентрация на кортикостерон в сравнение с контролната група (225 спрямо 200 ng/ml), отглеждана при режим с 12 ч. светлина и 12 ч. тъмнина.

Предвид всичко това, е твърде вероятно в условия на хронично излагане към светлина да участват както фактори на ендотелния слой, така и допълнителни стресови фактори, които повишават секрецията на кортикостерон над обичайното ниско ниво в светлата част от денонощието, отчетено при запазен режим светлина-тъмнина.

Въз основа на по-горните обстоятелства може да се приеме, че през повечето време в светлата част от денонощието, нощни животни като Wistar плъховете ще бъдат с понижена секреция както на мелатонин, така и на основния глюкокортикоид кортикостерон. Обратно, през повечето време в тъмната част от денонощието, секрецията на тези два хормона ще бъде в своя максимум. Поради това става видно, че съществена особеност на модела на мелатонинов дефицит с постоянно излагане към светлина е същевременното създаване на условия за дисбаланс в нивото на секретирания кортикостерон. От друга страна използването на пинеалектомията като модел за индуциран мелатонинов дефицит запазва циркадианната осцилация на секреция на кортикостерон при същевременно блокиране на образуването на мелатонин. Следователно възможно е отчетените противоположни резултати между собствените изследвания, получени в отсъствие на вещества, и изследванията на други автори да се дължат именно на разликата в ефекта на използвания модел върху секрецията на кортикостерон. Запазването на възможността за циркадианна осцилация на кортикостерон при същевременно блокиране физиологичната роля на мелатонин в модел с проведена пинеалектомия вероятно създава условия за настъпване на различни

изменения в структурата на аортната стена, а оттам и на вискозоеластичните ѝ характеристики.

Липсата на значителна разлика в съкратителната активност на препаратите, както от пинеалектомирани, така и от sham-оперирани животни показва, че в отсъствие на вещества операцията и последващата двуседмична хипомелатонинемия не проявяват самостоятелни ефекти върху гладкомускулната съкратимост. Тези резултати са в съответствие с данни на Kurcer et al., които показват, че понижените нива на мелатонин два месеца след проведена пинеалектомия не водят до промени в гладкомускулната чувствителност на аортни препарати от плъх с предварително отстранен ендотелен слой, които са били третирани с някои вазоконстриктивни вещества (в т.ч. фенилефрин, серотонин, калций, клонидин, вазопресин и ангиотензин II, но с изключение единствено на ендотелин-1, при който е била отчетена статистически значима повишена съкратимост единствено в концентрация  $3 \times 10^{-10}$  mol/L).

### 5.3 Фентанил

В сравнение с контролното измерване в sham групата на 3-месечни плъхове, приложението на фентанил понижава както собствената честота ( $f_0$ ), така и модула на еластичност ( $E'$ ) в тази възрастова група. За  $f_0$  този ефект е отчетен като статистически значим само с най-високата концентрация на фентанил –  $10^{-6,3}$  M ( $5 \times 10^{-7}$  mol/L), докато за  $E'$  ефектът е достоверен с всички изследвани концентрации. С останалите, по-ниски концентрации на фентанил също се наблюдава тенденция към понижаване на  $f_0$ , но с гранична значимост ( $p < 0,054-0,075$ ). Добавянето на  $10^{-6}$  M налоксон към повечето разтвори на фентанил в sham групата не неутрализира ефекта на последния върху  $E'$ , с изключение на разтвора с междинна концентрация  $10^{-8}$  M. Подобни, но по-малко значими резултати бяха получени и в pin групата, където в присъствие на  $10^{-6}$  M налоксон стойностите на  $f_0$  са значително по-ниски от контролното измерване само при най-високата концентрация фентанил  $10^{-6,3}$  M ( $5 \times 10^{-7}$  mol/L), а без добавен налоксон стойностите на  $E'$  са значително по-ниски от pin контролата само при  $10^{-7}$  M фентанил. Понижаването на стойностите на собствената честота и модула на еластичност на препаратите означава, че те са релаксирани и тяхната разтегливост е увеличена. Не е изключено, предвид малкия размер на статистическата извадка аортни препарати, при последващи разширени изследвания наблюдавания ефект на фентанил да се потвърди с достатъчна достоверност в по-широк интервал на неговата концентрация.

Други *in vitro* изследвания с аортни препарати от плъх са показали, че фентанил в концентрация  $\geq 10^{-6}$  mol/L оказва директен релаксиращ ефект върху предварително съкратена с фенилефрин аорта от плъх. Този ефект не е зависим от ендотела и се дължи на антагонистично свързване с  $\alpha_{1D}$ -адренергични рецептори, експресирани от васкуларните гладкомускулни клетки (Karasawa et al. (a), Park et al.). Така например в изследване на Park et al. е било установено, че фентанил в концентрации  $\geq 10^{-6}$  M ( $10^{-6}$  и  $10^{-5,52}$  M ( $3 \times 10^{-6}$  mol/L)) значително намалява мускулния тонус в предварително съкратени с фенилефрин аортни препарати от Sprague-Dawley плъхове, вследствие на обратим антагонизъм към  $\alpha_{1D}$ -адренергични рецептори. Karasawa et al. също показват, че предизвикваната от фентанил ( $10^{-6}$  и  $10^{-5}$  mol/L) релаксация е медирана от  $\alpha$ -адренергични рецептори, но и същевременно модулирана при наличие на запазен ендотелен слой. Същите автори съобщават за подобни резултати и със суфентанил и алфентанил, които действат директно върху гладките мускули (Karasawa et al. (b)). В

описаните по-горе собствени резултати (т. 5.2) ендотелът е отстранен и не повлиява на вискозоеластичността на гладката мускулатура (Georgiev et al., 2024). Интересно е, че подобен релаксиращ ефект на фентанил бе открит също и в рin групата на 3-месечните плъхове, но изглежда, че той не е достатъчен за да възстанови повишените стойности на вискозоеластичните характеристики в мелатонин-дефицитната аорта до нивата им, измерени в sham групата. Въпреки ефекта на фентанил, значителната разлика между sham и рin групите, предизвикана в резултат на пинеалектомията и хроничния мелатонинов дефицит, се запазва.

След като се вземат предвид литературните данни (т. 2.3.5) за измерените стойности на равновесната дисоциационна (инхибиторна) константа  $K_i$  ( $\approx 10^{-6}$  M) при антагонистичното свързване на фентанил към  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  и  $\alpha_{1D}$  адренорецептори, както и сведенията на Gisbert et al. за конститутивно активна популация от  $\alpha_{1D}$  адренорецептори експресирани в аортна стена на плъхове, може да се допусне, че въпреки липсата на предварително съкращение на гладкомускулните клетки с фенилефрин в собствените експерименти, при по-ниско ниво на базовият тонус също може да се очаква понижаване на тонуса и стойностите на вискозоеластичните характеристики (Torralva et al., Gisbert et al. (a), Gisbert et al. (b)). Съгласно уравнението на Hill-Langmuir (3), степента на свързване (заетост) на  $\alpha_{1D}$ -адренорецепторите при дадена концентрация на фентанил ще бъде:

(3)

$$P_{(fentanyl)} = \frac{X_f/K}{X_f/K + 1}$$

Където:

$X_f$  – концентрация на фентанил,  $\mu\text{mol/L}$

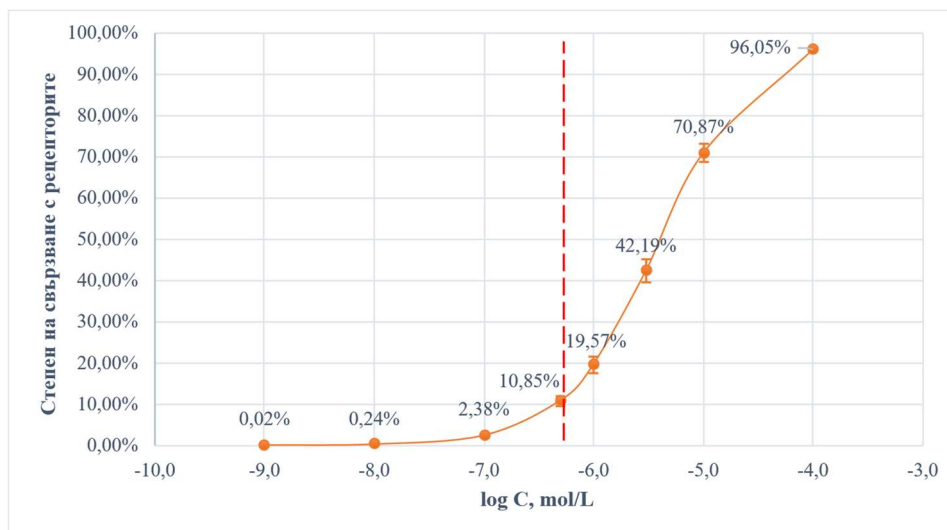
$K$  – дисоциационна константа на фентанил спрямо  $\alpha_{1D}$  адренорецепторите (средно  $4,11 \pm 0,45 \mu\text{mol/L}$ , по данни на Torralva et al., 2020)

Изчислените стойности за степен на свързаност с  $\alpha_{1D}$ -адренорецепторите при нарастващи концентрации на фентанил в интервала от  $10^{-9}$  до  $10^{-4} \text{ mol/L}$  са представени в Таблица 10 и Фигура 49.

**Таблица 10.** Степен на свързване на фентанил с  $\alpha_{1D}$ -адренорецепторите при концентрации от  $10^{-9} \text{ mol/L}$  до  $10^{-4} \text{ mol/L}$

| Log C    | C                  |                   | P <sub>(fentanyl)</sub>                      |   |  | Литературни и експериментални данни за концентрацията на приложение на фентанил |
|----------|--------------------|-------------------|--|---|--|---|
|          | mol/L              | $\mu\text{mol/L}$ | при $K_i$ min *<br>(3,66 $\mu\text{mol/L}$ ) | при средна $K_i$<br>(4,11 $\mu\text{mol/L}$ ) | при $K_i$ max *<br>(4,56 $\mu\text{mol/L}$ ) |   |
| -9       | $10^{-9}$          | 0,001             | 0,03%  | 0,02%   | 0,02%  | Собствени експерименти  |
| -8       | $10^{-8}$          | 0,01              | 0,27%  | 0,24%   | 0,22%  |   |
| -7       | $10^{-7}$          | 0,1               | 2,66%  | 2,38%   | 2,15%  |   |
| -6,30103 | $5 \times 10^{-7}$ | 0,5               | 12,02%                                       | 10,85%  | 9,88%  |   |
| -6       | $10^{-6}$          | 1                 | 21,46%                                       | 19,57%  | 17,99%                                       | Karasawa, 1993; Park, 2009  |
| -5,52288 | $3 \times 10^{-6}$ | 3                 | 45,05%                                       | 42,19%  | 39,68%                                       | Park, 2009  |
| -5       | $10^{-5}$          | 10                | 73,21%                                       | 70,87%  | 68,68%                                       | Karasawa, 1993  |
| -4       | $10^{-4}$          | 100               | 96,47%                                       | 96,05%  | 95,64%                                       | -   |

\* Стойностите за горна (max) и долна (min) граница на  $K_i$  са изчислени въз основа на стандартна грешка на средната (по Torralva et al., 2020).



**Фигура 49.** Степен на свързване на фентанил с  $\alpha_{1D}$  адренорецепторите при концентрация от  $10^{-9}$  mol/L до  $10^{-4}$  mol/L и средноаритметична  $K_i = 4,11 \pm 0,450$   $\mu$ mol/L ( $\pm$  SEM; n = 4). С прекъснатата вертикална линия е означена максималната използвана концентрация в проведените експерименти.

С оглед получената графика може да се приеме, че най-високата концентрация фентанил, която е използвана в собствените експерименти –  $10^{-6,3}$  M ( $5 \times 10^{-7}$  mol/L), блокира приблизително 10,85% от цялата популация рецептори в изследваната аортна гладкомускулна тъкан. Според модела на двете състояния (англ. two-state model) популацията от определен тип рецептор с известна конститутивна активност (в т.ч.  $\alpha_{1D}$ -адренорецепторите) може да съществува в две основни форми, които са в равновесно състояние помежду си: активна ( $R^*$ ) и неактивна ( $R$ ). Пълните агонисти преимуществено се свързват с  $R^*$ , измествайки равновесието в посока на активната форма на рецептора (висока ефикасност), частичните се свързват в по-ниска степен с  $R^*$  (ниска ефикасност), докато обратните агонисти се свързват преимуществено с  $R$  формата, измествайки равновесието в посока на неактивната форма на рецептора (отрицателна ефикасност). Антагонистите от своя страна се свързват в еднаква степен и с двете форми, като по този начин не изместват равновесието между двете, но същевременно блокират свързването на други молекули. Дори при допускане за равно разпределение на фентаниловите молекули между свързване с неактивни и активни  $\alpha_{1D}$  рецептори, изглежда достатъчен брой активни рецептори са блокирани от фентанил при концентрации под  $10^{-6}$  M, нарушавайки тяхната конститутивната активност, така че получените собствени резултати да показват статистически значими понижения на собствената честота и модула на еластичност спрямо контролните измервания с чист хранителен разтвор. Това явление може да бъде допълнително обяснено с известния факт, че спрямо конститутивно активни рецептори (каквито са  $\alpha_{1D}$ ) някои антагонисти всъщност действат като обратни агонисти, понижавайки тяхната базова вътреклетъчна сигнализация (Rodríguez-Pérez et al.).

В литературата се откриват значителен брой изследвания, в които се съобщава за експресия на опиоидни рецептори в артериалната стена, включително в ендотелни и гладкомускулни клетки, към които свързването на опиоидни агонисти води до промяна в съкратимостта на съдовата стена (Chen et al., Okano et al., Parra et al., Saeed et al., Stefano et al.). Въпреки това, в собствените изследвания перфузия с  $10^{-6}$  M налоксон или добавянето му в същата концентрация към разтвори на фентанил при повечето случаи не доведе до значителни промени в отчетените ефекти, което е в съответствие с резултатите

на Park et al. и Karasawa et al. (антагонизъм спрямо  $\alpha_{1D}$  в аортни препарати от плъх) и Gursoy et al. (в препарати от човешка радиална артерия), демонстриращи неопиоиден механизъм на действие на фентанил. Резултатите от изследването с метода за съкратителна активност допълнително подкрепят извода за неопиоидна активност на фентанил, поради липсата на антагонистичен ефект от приложения налоксон в концентрация  $10^{-6}$  mol/L. Също така, подобно на резултатите с метода за принудени трептения, ясна и статически значима зависимост на гладкомускулната съкратимост от концентрацията на фентанил не се открива. Възможни причини за липса на достатъчно значителен ефект върху съкратителната активност също биха могли да бъдат и условията на метода, който прилага полева електрическа стимулация, както и липсата на модулиращо влияние на предварително премахнатата периваскуларна съединителна тъкан, която е основната част от артериалната стена със съдържание на нервни окончания на вегетативната нервна система.

В допълнение към това, след почти пълно възстановяване на модула на еластичност при 30-минутна перфузия с чист хранителен разтвор, последващото прилагане на  $10^{-6}$  mol/L разтвор на налоксон доведе до повторно значително намаление на  $E'$  в sham групата, включително и с последващо включване на фентанил. Този резултат не бе очакван, като се има предвид предполагаемия противоположен ефект на антагониста налоксон, вследствие на конкурентно свързване към опиоидните рецептори и блокиране действието на фентанил. Възможно обяснение би могло да бъде съществуването на алтернативен, неопиоиден механизъм на действие на налоксон в конкретната тъкан и приложена концентрация. Така например в проучване на Migheli et al. е показано, че налоксонът намалява прекомерното извънклетъчно образуване на свободни кислородни радикали (ROS) в PC12 клетки от феохромоцитом на плъх. Това доказателство предоставя една възможна връзка между известното участие на ROS в междуслойната сигнализация на артериалната съдова стена и ефекта на налоксон, описан в резултатите от настоящото проучване (Chen et al.). По-нататъшното изследване на независимия ефект на налоксон без предварителна обработка с опиоиден агонист би могло да бъде от полза за допълнително изясняване на тези наблюдения.

Обратно на резултатите в sham групата, самостоятелният ефект на налоксон в rip групата не бе отчетен като статистически значим, докато предизвиканото от фентанил понижение на  $E'$  не бе неутрализирано нито след 30-минутната перфузия с чист хранителен разтвор, нито след последващото приложение на  $10^{-6}$  mol/L налоксон. Възможно обяснение за този резултат е невъзможността на фентанил да се отмие напълно от rip препаратите. Това предположение е в съответствие със собственото емпиричното наблюдение, че аортните препарати от пинеалектомирани плъхове макроскопски показват повишено натрупване на мазнини в сравнение с нормалните (sham) препарати. Според Sutcliffe et al. по-високата липофилност на молекулата на фентанил улеснява нейното повишено натрупване и задържане във фосфолипидната мембрана на клетките. Тази хипотеза би могла да обясни намалената способност на фентанил да се отмива, но също и невъзможността действието му да бъде неутрализирано достатъчно бързо и ефективно от опиоидния антагонист налоксон (Sutcliffe et al.). Във фармакологичните изследвания на конкурентен антагонизъм, за разлика от реалната клинична практика, първото вещество, което се прилага, е антагонистът, който се оставя да достигне равновесие с рецепторите, едва след което се добавя и опиоидния агонист (Kelly et al.). При лечението на предозиране с опиоиди антагонистът, обикновено налоксон, се прилага след като вече се е развил определен отговор на организма към приетия агонист (Kelly et al.). Множество изследвания през последните години, разглеждащи ефектите на някои опиоидни аналгетици като

фентанил и последващото приложение на налоксон, показват, че е необходимо на практика приложената доза опиоиден антагонист да бъде значително завишена или повторена многократно, за да бъде неутрализирано предозирането с фентанил (Kelly et al.).

За изследване на чувствителността на някои опиоидни аналгетици към налоксон, Hill et al. се фокусират върху способността на последния да неутрализира респираторната депресия в отговор на терапевтично еквивалентни, сублетални дози морфин и фентанил. След изчакване на ефекта от двете вещества да достигне стабилно състояние преди прилагането на налоксон, изключвайки възможността за фармакокинетични усложнения, произтичащи от по-бързото начало на действие на фентанил, Hill et al. откриват, че за да се неутрализира ефекта на фентанил е необходима около 10 пъти по-висока доза налоксон, отколкото необходимата за морфин. Те показват, че дори относително ниски дози фентанил трудно се повлияват от приложения впоследствие налоксон. Нещо повече, липофилният опиоиден антагонист дипренорфин е еднакво ефективен при неутрализиране на потискането на дишането от страна на фентанил и морфин (Hill et al.). В резултат на това би могло да се направи предположение, че е вероятно наличието на неравновесно взаимодействие между налоксон и фентанил при  $\mu$  рецептора, тъй като при равновесни условия налоксонът като конкурентен антагонист би трябвало еднакво да неутрализира действието и на двата опиоидни агониста, независимо от техния афинитет и ефикасност към рецептора (Kelly et al.). В допълнение към това също може да се направи извод, че поради липсата на промяна в действието на фентанил след третиране с налоксон, вероятно липсва силно изразена самостоятелна активност на опиоидните рецептори в изолираната артериална гладкомускулна тъкан. Вероятно нетният ефект се дължи на действие, медирано от  $\alpha_{1D}$ -адренорецептори самостоятелно или в комбинация с опиоидни и други рецептори, но не и на самостоятелно действие, опосредствано от опиоидните рецептори.

По-ниските нива на  $f_0$  и  $E'$  в торакалната аорта на 3-месечните плъхове, вследствие от прилагането на фентанил, могат да представляват риск за достигане на увреждащи ендогенни или външни за организма трептения при по-ниски честоти, както и намалена твърдост на артериалната стена (т.е. повишена разтегливост) в сравнение с нетретирана с фентанил аорта. Откритият *in vitro* релаксиращ ефект на фентанил в sham групата аортни препарати от 3-месечни плъхове би могъл да се разглежда като подкрепящ клиничните данни за хипотензивен ефект при човек, въпреки допълнителното участие на нервната и хуморалната регулация *in vivo* (Kim et al.). Този факт не е изненадващ, предвид че артериалната хипотензия при човека попада сред известните фармакологични ефекти на фентанил *in vivo* (Kim et al.).

За разлика от ефектите на фентанил, водещи до понижението на  $f_0$  и  $E'$  в аортните препарати от 3-месечни плъхове, третирането с фентанил на препарати от 14-месечни животни предизвиква не толкова еднозначни резултати. Така например, ако повишението на  $E'$  в sham и pin групата на 14-месечните плъхове е с напълно противоположна посока на ефекта спрямо отчетения при 3-месечните (понижение на  $E'$ ), то третирането с фентанил във възрастната група на 14-месечните плъхове води до значително по-ниски стойности на  $f_0$  при sham-оперираните (подобно на ефекта наблюдаван при 3-месечните), но не предизвиква статистически значими разлики спрямо контролното измерване при пинеалектомираните. По друг начин казано, фентанил предизвиква понижението на собствената честота в sham групата на двете възрастови групи, а в pin групата води до понижението само при 3-месечните, но без значителна промяна в стойностите при по-възрастните. Независимо от пинеалния статус,

прилагането на фентанил понижава модула на еластичност на аортни препарати от 3-месечните плъхове, докато при тези от 14-месечни го повишава.

На пръв поглед повишаването на  $E'$  в торакалната аорта от 14-месечни плъхове не отговаря на наличните литературни данни от други *in vitro* изследвания, проведени с приложение на фентанил в изолирана аортна гладкомускулна тъкан от плъх или човек, при която ендотелния слой е нарушен. Възможно обяснение на този ефект би могло да бъде получено от изследването на Sohn et al., показващо, че фентанил в концентрации над  $0,297 \times 10^{-6}$  M намалява вазорелаксацията, предизвикана от активиране на  $M_3$  рецептори в запазен ендотел на предварително съкратени с фенилефрин аортни препарати от плъх. Тъй като ендотелния слой на аортните препарати, използвани в собствените изследвания, е предварително премахнат, механизмът на действие на фентанил трябва да засяга цели, откриващи се специфично в гладкомускулния слой на артерията. Аналогично на механизма на действие открит в ендотела, такава цел за фентанил може да се допусне, че съществува и в ГМК въз основа резултатите на Lee et al. Тяхното изследване показва, че във васкуларни ГМК ацетилхолинът увеличава фосфорилирането на протеините LKB1 и AMPK, което изисква активиране на мускаринови рецептори, експресирани от същите клетки (Lee et al.). Освен това, изследване на мускулния тонус показва наличие на инхибиторен ефект на ацетилхолин-индуцираната AMPK активация върху фенилефрин-медираното съкращение в аорта на плъх с премахнат ендотел (Lee et al.). Според Lee et al. ацетилхолин-индуцираната активация на AMPK (AMФ-активирана протеин киназа) в аорта на плъх с премахнат ендотел може да отслаби вазоконстрикцията чрез LKB1–AMPK-зависим механизъм.

Взети заедно, резултатите на Lee et al. и Sohn et al. биха могли да се разглеждат като подкрепящи хипотезата за вазоконстриктивен ефект на фентанил в изолирана аортна тъкан на 14-месечни плъхове, вследствие блокиране на вътреклетъчен сигнален път на активираните ацетилхолинови рецептори. Предвид, че в една и съща тъкан са едновременно възможни два отделни механизма на действие на фентанил, които също така имат противоположна посока на действие спрямо  $E'$ , изглежда вероятно разликата в наблюдаваният нетен ефект между 3- и 14-месечни плъхове да се дължи на възрастово-зависима разлика в степента на експресия на  $\alpha_{1D}$  и  $M_3$  рецептори (или активираните от тях вътреклетъчни вторични посредници).

## 5.4 Трамадол

В sham и pin групите на аортни препарати от 3-месечни плъхове, приложението на трамадол не доведе до статистически значими разлики в средните стойности за  $f_0$ ,  $E'$  и  $\beta$ , при сравнение с контролните измервания в същите групи. В sham групата препарати от 3-месечни плъхове, 10-минутната перфузия с  $10^{-6}$  mol/L налоксон значително намали  $E'$  ( $p < 0,05$ ) спрямо средната стойност с най-високата концентрация трамадол ( $10^{-4,3}$  mol/L), показвайки вероятен механизъм да действие, в който участват опиоидни рецептори. Статистически значими разлики в средните стойности между отделните концентрации трамадол не бяха установени в sham групата. Обратно на това, в pin групата на 3-месечни плъхове беше открита известна степен на зависимост на  $E'$  от концентрацията, а именно понижена средна стойност при най-високата концентрация трамадол ( $10^{-4,3}$  mol/L) в сравнение с най-ниската –  $10^{-7}$  mol/L. Понижение на  $E'$  спрямо най-ниската концентрация, но с гранична значимост бе установено също и след перфузия на препаратите с  $10^{-5}$  mol/L трамадол ( $p = 0,0579$ ).

За разлика от 3-месечните, в препаратите от 14-месечни плъхове бяха отчетени статистически значими разлики в средните стойности, както за  $f_0$ , така и за  $E'$ . Двете вискозоеластични характеристики имат значително по-ниски стойности не само спрямо контролните измервания в sham групата, но и след 30-минутната перфузия с чист хранителен разтвор, както и след 10-минутното третиране с  $10^{-6}$  mol/L разтвор на налоксон. Понижаването на стойностите на собствената честота и модула на еластичност на препаратите означава, че те са релаксирани и тяхната разтегливост е увеличена. Този резултат би могъл да се интерпретира както като доказателство, че трамадол се отмива значително по-добре (със значително по-ниска степен на натрупване в аортната тъкан) в сравнение с фентанил, така и като аргумент срещу преобладаващ опиоиден механизъм на действие, поради еднаквата посока на ефекта, предизвикан от разтворите без включен трамадол (чист хранителен разтвор, като начална контрола, след 10-минутна перфузия, и след  $10^{-6}$  mol/L разтвор на налоксон). Подобно на резултатите с sham групата 3-месечни плъхове, статистически значими разлики в средните стойности между отделните концентрации трамадол не бяха установени. От друга страна, в рип групата аортни препарати от 14-месечни плъхове, въздействието с почти всички изследвани концентрации трамадол и трамадол +  $10^{-6}$  mol/L налоксон доведе до значително повишение в средните стойности на  $f_0$  спрямо контролното измерване в същата група, докато за  $E'$  не бяха отчетени значителни разлики. Повишаването на собствената честота на препаратите означава, че те са с повишен риск за резонанс вследствие на увреждащи еднородни или външни за организма трептения при по-високи честоти, съвпадащи с повишената собствена честота. В същата група статистически значими разлики в средните стойности между отделните концентрации трамадол не бяха установени, в противовес на резултатите с рип групата на 3-месечните животни.

С цел обяснение на концентрационно-зависимия биполярен ефект на трамадол, бе проведен преглед на литературата за изясняване на възможните механизми. Вследствие на това беше установено, че лекарствените продукти, включващи активното вещество трамадол, под формата на неговата сол трамадолов хидрохлорид, съдържат рацемична смес (1:1) от двата основни енантиомера на трамадол – (1*R*,2*R*)-(+)-трамадол и (1*S*,2*S*)-(-)-трамадол, известни също като R(+)-трамадол и S(-)-трамадол. Стереоселективни *in vitro* изследвания в аортни препарати от мъжки плъхове са показали съществена разлика между ефектите на двата енантиомера на трамадол (Cho et al., Raimundo et al.). Докато при S(-)-трамадол е доказано свързване и агонизъм спрямо  $\mu$ -опиоидни рецептори, в концентрации от 0,1 до 1,0 mM (от  $1 \times 10^{-4}$  до  $1 \times 10^{-3}$  mol/L), то при R(+)-трамадол такива не са открити (Raimundo et al.). Известно е също така, че *in vivo* опиоидните ефекти на трамадол при човек се дължат на неговия основен метаболит десметрамадол (О-дезметилтрамадол), при който е измерен около 700-пъти по-висок афинитет към  $\mu$ -опиоидните рецептори, отколкото при трамадол (Raffa et al.).

В предварително съкратени с фенилефрин аортни препарати от Wistar плъхове, Raimundo et al., 2006 съобщават за частично зависима от ендотела вазорелаксация след високи концентрации S(-)-трамадол ( $>2 \times 10^{-4}$  mol/L), която се неутрализира в присъствие на 0,1  $\mu$ M ( $10^{-4}$  mol/L) налоксон, но при сравнение със запазен ендотелен слой в негово отсъствие тя е по-слабо изразена. В същото изследване вазорелаксацията и последващия хипотензивен ефект са потвърдени *in vivo* при неанестезирани плъхове, след *i.v.* bolus инжектиране на S(-)-трамадол в дози от 5 и 10 mg/kg, а след приложение на R(+)-трамадол е отчетен хипертензивен ефект (Raimundo et al.). С по-ниски дози на рацемичния ( $\pm$ )-трамадол ( $\leq 5$  mg/kg) и в сравнение с R(+)-трамадол е отчетен по-слаб, но статистически значим хипертензивен ефект (при средно и систолно кръвно налягане, но не и при диастолно), докато при по-високи дози ( $\pm$ )-трамадол (10 mg/kg) е измерено

незначително понижение както при систолното, така и при диастолното кръвно налягане – слаб хипотензивен ефект (Raimundo et al.).

От друга страна, според Shin et al., 2006, при запазен ендотел, по-ниска концентрация на R(+)-трамадол ( $5 \times 10^{-5}$  mol/L) предизвиква по-силно съкращаване на предварително вазорелаксирани с ацетилхолин аортни пръстени от мъжки Sprague Dawley плъхове, в сравнение с по-висока концентрация S(-)-трамадол ( $10^{-4}$  mol/L). Наблюдаваният ефект в торакална аорта се свързва с потискане на активирането на азотен оксид синтазата, включително с участието на неспецифични ендотелни рецептори, но не и на мускаринови или опиоидни (Shin et al.). По данни на Cho et al., 2007, както R(+)-трамадол, така и S(-)-трамадол, в концентрация от  $10^{-5}$  M, намаляват индуцираната от левкромакалим (активатор на АТФ-чувствителни калиеви канали;  $K_{ATP}$ ) вазорелаксация на изолиран (без ендотел) аортен гладкомускулен слой от мъжки Sprague Dawley плъхове. Индуцираното от R(+)-трамадол отслабване на вазорелаксацията отговор, предизвикан от левкромакалим, отново е значително по-силно от това, индуцирано от S(-)-трамадол (Cho et al.). Установено е, че трамадол-индуцираното потискане на вазорелаксацията, предизвикана от левкромакалим, се извършва без активиране на опиоидни рецептори, подобно на резултатите на Shin et al., 2006 със запазен ендотел (Cho et al.). При все това, тук трябва да бъде отбелязано, че нетният хемодинамичен ефект на трамадол *in vivo* представлява сбор от всички васкуларни, миокардни и неврални ефекти.

Наблюдаваните ефекти, специфични за всеки един от двата енантиомера на трамадол, се съобщават и за рацемичната смес. Лекарственото действие върху артериите при ниски концентрации / дози на ( $\pm$ )-трамадол ( $\leq 5$  mg/kg) е предимно вазоконстриктивно, вследствие на синергичния съкратителен ефект на R(+)-трамадол (в по-голяма степен) и S(-)-трамадол (в по-малка), имащи равно съотношение в рацемичната смес. Обратно, лекарственото действие върху артериите при високи концентрации / дози на ( $\pm$ )-трамадол ( $\geq 10$  mg/kg) е предимно вазорелаксиращо, вследствие на преобладаващия самостоятелен ефект от S(-)-трамадол върху  $\mu$ -опиоидни рецептори в артериалната стена. Поради тази причина трябва да се има предвид, че прилаганите в практиката лекарствени продукти, съдържащи ( $\pm$ )-трамадол, имат доза-зависимо действие по отношение на съкращението на васкуларната мускулатура (( $\pm$ )-трамадол е типичен пример за т.нар. хормезис).

Предвид, че равновесието между свързване и дисоциация на трамадол с  $\mu$  опиоидните рецептори, при плъх, е около  $2,4 \times 10^{-6}$  mol/L ( $K_i = 2,4$   $\mu$ M) и за разлика от фентанил, молекулата е само частичен агонист спрямо  $\mu$  опиоидните рецептори, може да бъде направено предположение, че с използваните концентрации ( $10^{-7}$  до  $5 \times 10^{-5}$  mol/L) в собствените експерименти ( $\pm$ )-трамадол би могъл да прояви слаб ефект само в двете най-високи концентрации –  $10^{-5}$  и  $5 \times 10^{-5}$  M. Противоположната посока на ефекта на трамадол спрямо собствената честота в sham и pin групите, на аортни препарати от 14-месечни плъхове, би могла да се тълкува като въздействие на мелатониновия дефицит, вследствие на извършената пинеалектомия. Резултатите от изследването с метода за съкратителна активност допълнително подкрепят извода за преобладаващ неопиоиден механизъм на действие на трамадол, поради липсата на антагонистичен ефект от приложения налоксон в концентрация  $10^{-6}$  mol/L. Също така с този метод, подобно на резултатите с метода за принудени трептения не се открива ясна и статически значима зависимост на гладкомускулната съкратимост от концентрацията на трамадол. Възможни причини за липса на достатъчно значителен ефект върху съкратителната активност също биха могли да бъдат и условията на метода, който прилага полева

електрическа стимулация, както и липсата на модулиращо влияние на предварително премахнатата периваскуларната съединителна тъкан, която е основната част от артериалната стена със съдържание на нервни окончания на вегетативната нервна система.

## 6. Заключение

С това изследване се предоставят нови доказателства, че *in vitro* фентанил действа по неопиоиден и ендотел-независим механизъм като директен вазорелаксant в медиалния слой на артериалната стена, в подкрепа на вече известното хипотензивно действие *in vivo*. Това действие на фентанил е изразено предимно в препарати от помлади плъхове отколкото при такива от зрели животни. По отношение на трамадол се предоставят нови доказателства за *in vitro* действие върху собствената честота и артериалната твърдост, което е зависимо от приложената концентрация и възрастта на експерименталните животни. В зрели плъхове, трамадол също действа като директен ендотел-независим вазорелаксant, но с предполагаем опиоиден механизъм на действие. Противоположната посока на ефекта на трамадол, спрямо собствената честота в аортни препарати от нормални и дефицитни на мелатонин 14-месечни плъхове, се свързва с въздействие на извършената пинеалектомия. Необходими са допълнителни изследвания за изясняване на възможните механизми на действие на двете вещества в изолирана гладкомускулна аортна тъкан в плъх, но и в човек. Представените резултати могат да подобрят клиничните решения за овладяване на силна болка с помощта на опиоидни аналгетици като фентанил и трамадол или при обща анестезия с фентанил, при определени пациенти с коморбидни заболявания и хронично ниски нива на мелатонин в кръвната плазма.

## 7. Изводи

1. Ефектът на възрастта, оценен в отсъствие на фармакологично активни субстанции, се изразява в значително по-ниска артериална твърдост при препарати от низходяща торакална аорта на 18-месечни sham-оперирани плъхове в сравнение с тези от 3- и 14-месечни животни.
2. Мелатониновият дефицит, оценен в отсъствие на фармакологично активни субстанции, оказва понижаващ ефект върху вискозоеластичните характеристики: при препарати от 18-месечни плъхове понижава собствената честота и артериалната твърдост, а при 3-месечни – единствено артериалната твърдост. Обратно, в присъствие на ниски концентрации фентанил ( $10^{-9}$  mol/L) и трамадол ( $10^{-7}$  mol/L), дефицитът на мелатонин повишава двете вискозоеластични характеристики при 3-месечните.
3. Фентанил значително понижава двете вискозоеластични характеристики в аортни препарати от 3-месечни плъхове, независимо от мелатониновия статус, насочвайки риска от увреждащи трептения към резонанс при по-ниски честоти, както и към повишена разтегливост на артериална стена. При 14-месечни плъхове, фентанил също води до значително понижение на собствената честота при препарати от sham-оперирани животни, но същевременно повишава артериалната твърдост независимо от мелатониновия статус.
4. Ефектите на фентанил не се повлияват от опиоидния антагонист налоксон, което показва, че отчетения отговор се дължи на преобладаващ неопиоиден механизъм на действие.

5. Понижените вискозоеластични характеристики вследствие на прилагането на трамадол при препарати от 14-месечни sham-оперирани и 3-месечни пинеалектомирани плъхове показват, че рискът от увреждащи трептения е насочен към резонанс при по-ниски честоти, а артериалната разтегливост е увеличена. Обратно, значително повишената собствена честота при дефицитни на мелатонин 14-месечни плъхове показва, че рискът от увреждащи трептения е насочен към резонанс при по-високи честоти, а противоположната посока на ефекта спрямо собствената честота в двете групи 14-месечни животни би могла да се тълкува като проява на въздействието на мелатониновия дефицит.
6. Приложението на фентанил (от  $10^{-9}$  до  $5 \times 10^{-7}$  mol/L) или трамадол (от  $10^{-7}$  до  $5 \times 10^{-5}$  mol/L) не води до значителни промени в коефициента на вискозни загуби.
7. Самостоятелно приложение на налоксон *in vitro* води до намалена твърдост на аортната стена, изолирана от sham-оперирани 3-месечни плъхове, което показва вероятност за допълнителен механизъм на действие.
8. Индуцирания хроничен мелатонинов дефицит не води до значителна промяна в съкратителната активност на аортните препарати. Също така нито фентанил (от  $10^{-9}$  до  $5 \times 10^{-7}$  mol/L) и трамадол (от  $10^{-7}$  до  $5 \times 10^{-5}$  mol/L) повлияват тонуса на гладката мускулатура, нито добавянето на  $10^{-6}$  mol/l налоксон, както самостоятелно, така и в комбинация с всеки един от опиоидните аналгетици.

## 8. Приноси

1. Доколкото е известно от проучените литературни данни, за първи път са изследвани директните ефекти на опиоидните аналгетици фентанил и трамадол върху вискозоеластичните характеристики на лентовидни препарати от низходяща торакална аорта на Wistar плъхове в зависимост от възрастта, както след проведена sham-операция, така и в условия на индуциран мелатонинов дефицит след пинеалектомия. Спрямо други изследвания с фармакологично активни субстанции, получените резултати допълнително предоставят не само качествена, но и количествена оценка за вискозоеластичните характеристики, при това без влияние на ендотелния слой и периваскуларната мастна тъкан.
2. Предоставят се нови доказателства, че *in vitro* фентанил действа по неопиоиден и ендотел-независим механизъм като директно намалява вискозоеластичните характеристики в медиалния слой на аортната стена, в подкрепа на вече известното хипотензивно действие *in vivo*. Трамадол също действа върху вискозоеластичните характеристики независимо от ендотела, но с предполагаем опиоиден механизъм и противоположна посока на ефекта в зависимост от концентрацията.
3. Установена е модулация на артериалните механични свойства при фармакологично въздействие с фентанил и трамадол, която зависи от възрастта и наличието на мелатонинов дефицит. Резултатите имат потенциално клинично значение, подчертавайки необходимостта от индивидуализиран подход при опиоидна аналгезия при хора с отчитане на възрастта и мелатониновия статус.
4. Изследван е ефекта на опиоидните аналгетици фентанил и трамадол върху съкратителната активност на изолиран гладкомускулен слой от торакалната аорта на sham-оперирани и пинеалектомирани Wistar плъхове.

## Списък с публикации

- Georgiev A, Kaneva M, Shikova L, Antonova M. Experimental estimation and comparison of viscoelastic characteristics of rat aorta in vitro. Ser Biomech. 2022;36(1):86-97. doi:10.7546/SB.12.2022 **SJR 0.2, Q4**
- Georgiev A, Kaneva M, Shikova L, Mateeva P, Tchekalarova J, Antonova M. In Vitro Effects of Fentanyl on Aortic Viscoelasticity in a Rat Model of Melatonin Deficiency. Int J Mol Sci. 2024;25(11):5669. doi:10.3390/ijms25115669 **IF 4.9, Q1**
- Antonova M., Georgiev A, Totev T. A device for implementation of the forced oscillation method on strip preparations of biological tissues in vitro in prolonged experiments. J Theor Appl Mech, Sofia. 2024;54:159-171. doi: <https://doi.org/10.55787/jtams.24.54.2.159> **IF0.3, Q4**

## Списък с участия на национални и международни форуми

### Доклади на научен форум в страната

- 3-ти интердисциплинарен докторантски форум, Българска академия на науките. Кюстендил, България. 6-7 юни, 2022 г. Постер: „Изследване на зависимостта концентрация-ефект върху вискозоеластичните характеристики на препарати от аорта на плъх при директно въздействие с опиоидни аналгетици“
- III-та Национална научна конференция „Дръзновение и младост във фармакологията“. Цигов чарк, България. 30 септември – 2 октомври 2022 г. Постер: „Изследване на влиянието на мелатонин и зависимостта концентрация-ефект върху вискозоеластичните характеристики на препарати от аорта на плъх при директно въздействие с опиоидни аналгетици in vitro“

### Доклади на научен форум в чужбина или на международен научен форум в страната

- 6th Eurosummer School on Biorheology and Symposium on Micro and Nano Mechanics and Mechanobiology of Cells, Tissues and Systems (BIORHEO 2018), Varna, Bulgaria, August 29th – September 1st 2018. Постер: „Effects of morphine and naloxone on the viscoelastic characteristics of rat aorta in vitro. Preliminary results“
- 7th Eurosummer School on Biorheology and Symposium on Micro and Nano Mechanics and Mechanobiology of Cells, Tissues and Systems (BIORHEO2021). Varna, Bulgaria. August 28th – 31st, 2021. Доклад: „Experimental estimation and comparison of viscoelastic characteristics of rat aorta in vitro“
- International Conference of The Bulgarian Society of Physiological Sciences. Stara Zagora, Bulgaria. October 30th – November 1st, 2022. Постер: „Viscoelastic characteristics of aortic in vitro preparations from sham-operated and pinealectomized rats“
- 8th Eurosummer School on Biorheology and Symposium on Micro and Nano Mechanics and Mechanobiology of Cells, Tissues and Systems (BIORHEO2024). Varna, Bulgaria. August 28th – 30th, 2024. Постер: „Comparative in vitro investigation of viscoelasticity in aging of healthy/melatonin deficient rat aorta“

## Списък с участия в проекти

- Договор № КП-06-Н-41/4 от 30.11.2020, финансиран от Фонд научни изследвания по проект „Проучване влиянието на мелатониновия дефицит върху някои механизми на стареене при експериментален модел“. Ръководител на проекта: проф. д-р Яна Чекаларова.

BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES  
INSTITUTE OF NEUROBIOLOGY  
DEPARTMENT OF BEHAVIORAL NEUROBIOLOGY

**In vitro effects of opioid analgesics on the viscoelastic characteristics of  
rat aortic wall during aging and melatonin deficiency**

Doctoral Thesis in Pharmacology

Author:

Andreyan Georgiev

Supervisor:

Assoc. Prof. Mariya Antonova

Scientific consultant:

Prof. Rositsa Zamfirova

**Abstract**

The biomechanical behaviour of arteries describes the interaction between the mechanical properties of the vascular wall and the hemodynamic load, determining its deformation response. This interdisciplinary approach expands the possibilities for analysing and predicting the effect of individual stimuli and conditions on the arterial wall. One of the indicators for monitoring changes in the deformation response of arteries is vascular viscoelasticity. The study of this indicator, excluding the influence of nervous and humoral regulation by the body, is carried out in in vitro experiments, assessing the direct impact of the substances used on arterial tissue preparations. Numerous studies have examined the biomechanical behaviour of arteries under the influence of certain internal and external factors. One of these factors is the influence of drugs administered directly into the systemic circulation. Knowledge of the effects on the cardiovascular system of drugs from the group of opioid analgesics is of interest for clinical practice due to the possibility of improving their therapeutic efficacy and safety. Opioid analgesics such as fentanyl and tramadol are used in medical practice to suppress severe acute or chronic pain, as well as in balanced general anaesthesia used in surgical interventions. Their use requires in-depth knowledge of the action of the particular analgesic on the circulatory system, taking into account possible changes in the biomechanical response of the arteries, the presence of underlying pathology and comorbid conditions.

In some studies, fentanyl has been shown to indirectly affect the tone of vascular muscles by two independent mechanisms of action, other than the activation of opioid receptors: suppression of the vasodilating effect of the acetylcholine-stimulated endothelial layer by inhibiting the intracellular signalling pathway of activated M<sub>3</sub>-cholinoreceptors; suppression of the vasoconstrictive effect of phenylephrine, in which fentanyl competes with it for binding to  $\alpha_1$ -adrenoreceptors on the surface of smooth muscle cells in the absence of an endothelial layer. Regarding tramadol, the effect of its enantiomers on arterial muscle contraction in Wistar rat thoracic aorta preparations pre-contracted with phenylephrine showed that R(+)-tramadol, but

not S(-)-tramadol, induces endothelium-dependent vasorelaxation. R(+)-tramadol affects both  $\mu$  opioid receptors in the endothelium and those in the media, although to a lesser extent. S(-)-tramadol, in turn, inhibits the reuptake of noradrenaline. It has been established that the analgesic effect of tramadol in the CNS is due to the synergy between the different mechanisms of action of the two enantiomers.

Among other factors that have an impact on the biomechanical behaviour of arteries is the age-related remodelling of the arterial wall. This process occurs in shorter or longer time intervals and, depending on this, can be reversible or irreversible. The change in the biomechanical properties of the aortic wall significantly increases the risk of developing cardiovascular diseases such as hypertension, aortic aneurysm, aortic dissection, and others. Because the biomechanical stress in the arterial tree is greatest at its beginning, the aging of the aorta is the fastest compared to other large blood vessels. Characteristic for this process is the increase in the diameter and stiffness of the artery, as well as the loss of distensibility under the influence of intraluminal pressure.

A number of hormones, including melatonin, are another factor in the biomechanical behaviour of arteries. It is known that with advancing age, melatonin secreted by the pineal gland (epiphysis) in most mammals (including humans) decreases. However, in addition to age, a decrease in the plasma concentration of the pineal hormone is also found in younger individuals with some neurological, neurodegenerative, oncological, metabolic, and rare congenital diseases. Chronic exposure to artificial light at night also suppresses melatonin secretion. Given all this, it can be assumed that pineal gland dysfunction and the associated melatonin deficiency are not a rare phenomenon. The endocrine, neuroregulatory, immunosuppressive, antioxidant and anti-inflammatory effects of melatonin are well described in the literature, with many studies demonstrating the significant influence of the pineal hormone on the homeostasis of the arterial wall, but nevertheless its direct and indirect effects on its biomechanical properties remain insufficiently studied. This necessitates the need to conduct additional studies on the influence of melatonin deficiency on the viscoelasticity of the arterial wall in relation to possible cardiovascular complications after the administration of opioid analgesics before, during or after surgical procedures.

The results of this study could contribute to improving the therapeutic choice of opioid analgesics and their dosing in order to reduce adverse effects on the cardiovascular system, at a physiological level of melatonin secreted by the pineal gland, in conditions of melatonin deficiency, as well as depending on the age of the patients.