

Борис Георгиев Кадинов

**Роля на въглеродния оксид в регулиране
на съкратителната активност
на висцерални мускули**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

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

Професионално направление 4.3 “Биологически науки“
научна специалност “Физиология на животните и човека”

Научен консултант: Чл.кор. д-р Радомир Радомиров

София
2014

Дисертационният труд е написан на 100 стандартни машинописни страници и е онагледен с 9 схеми, 22 фигури и 1 таблица. Библиографията включва 228 заглавия, от които 1 е на кирилица и 227 са на латиница.

Дисертацията е обсъдена и предложена за защита на научен колегиум на Института по невробиология- БАН, състоял се на 13.03.2014.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 11.06.2014 г. от 13:30 часа в залата на Институт по невробиология – БАН, ул. “Акад. Г. Бончев”, бл. 23, ет. 2. Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на Института по невробиология, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 23.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ

Борис Георгиев Кадинов

**Роля на въглеродния оксид в регулиране
на съкратителната активност
на висцерални мускули**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

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

научна специалност “Физиология на животните и човека”

Научен консултант: Чл.кор. д-р Радомир Радомиров, дмн

Официални ецензенти:

Проф. Д-р Рени Калфин, дм – ИНБ - БАН
Доц. Галя Ставрева – МУ - Плевен

София
2014

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	Въведение	6
II.	Цел и задачи	8
III.	Материали и методи	9
III.1.	Обекти на изследване	9
III.2.	Методи на изследване	9
III.2.1.	Метод на индуциране на оксидативен стрес с тежки метали	9
III.2.2.	Метод на индуциране на оксидативен стрес с водороден пероксид (H ₂ O ₂)	10
III.2.3.	Имунохистохимичен метод за доказване на Neme oxugenase	10
III.2.4.	Хистохимичен метод за доказване на NADPH	11
III.2.5.	Метод за регистриране на съкратителна активност на гладкомускулни препарати	11
III.2.6.	Метод за изолиране на <i>a. coronaris</i>	13
III.2.7.	Метод за изолиране на <i>a. basilaris</i>	13
III.2.8.	Метод за изолиране на <i>a. ophthalmica</i>	13
III.2.9.	Метод за регистриране на съкратителна активност на съдови сегменти	16
III.3.	Статистическа обработка на експерименталните резултати	16
III.4.	Разтвори и субстанции	16
III.4.1.	За изследване на съкратителна активност на гладкомускулни препарати от стомашно-чревен тракт	16
III.4.2.	За изследване съкратителната активност на съдови сегменти	16
IV.	Резултати и обсъждане	18
IV.1.	Участие на ендогенния въглероден оксид в реализиране на съкратителния отговор при гладко-мускулни препарати от фундус на стомах	18
IV.1.1.	Имунохистохимично доказване наличието на HO във фундус на стомах	18
IV.1.2.	Хистохимично доказване наличието на NADPH във фундус на стомах	19
IV.1.3.	Влияние на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на циркуларни гладкомускулни препарати от фундус на морско свинче	21
IV.2.	Участие на ендогенния въглероден оксид в реализиране на съкратителния отговор при съдови гладко-мускулни препарати	30
IV.2.1.	Влияние на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на съдови препарати от коронарна артерия на морско свинче	30
IV.2.2.	Влияние на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на съдови препарати от <i>a. basilaris</i> на морско свинче	35
IV.2.3.	Влияние на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на съдови препарати от <i>a. ophthalmica</i> на плъх	39
IV.3.	Промени в съкратителната активност на сегменти от кръвоносни съдове под влияние на свободни кислородни форми	41
V.	Заклучение	43
VI.	Изводи	48
VII.	Приноси	49
VIII.	Публикации по темата на дисертацията	50
IX.	Участие в национални и международни научни форуми във връзка с дисертационния труд	51

Често използвани съкращения:

CO – въглероден оксид
NO – азотен оксид
HO/HO1/HO2 – heme oxygenase, хем оксигеназа-1 /-2
CO-Hb – карбокси-хемоглобин
NOS – азотно-окисна синтаза
NADPHd – NAD-диафораза
SnPPIX – калаен протопорфирин - IX
sGC – разтворима гуанилат циклаза
NANC/НАНХ – неадренергичен нехолинергичен
VIP – вазоактивен интестинален полипептид
АТФ – аденозин трифосфат
SP – субстанция Р
IP₃ – инозитол трифосфат
SOD/СОД – супероксид дисмутаза
ROS – реактивни кислородни форми
GSH – глутатион
GPX – глутатион пероксидази
ПОЛ – пероксидно окисление на липидите
LOOH/ЛХП – липидни хидропрекиси
VSMC – съдови гладкомускулни клетки
ПНМК – полиненаситени мастни киселини
PKA/PKB/PKC – Протеин киназа А/ В/ С
ЕПС – електрическа полева стимулация
CORMs - CO-освобождаващи молекули
Hb - хемоглобин
Mb - миоглобин
BV - биливердин

I. Въведение

Дълги години въглеродният оксид (CO), който се съдържа в отработените автомобилни и промишлени газове и цигарения дим беше разглеждан единствено като отровен газ, който се отделя при непълното изгаряне на въглеводороди. За живите организми той е токсичен, влияе на централната нервна и сърдечно-съдовата системи. Той подтиска както вътреклетъчните оксиредуктази, така и транспорта на кислорода от кръвта към тъканите като се свързва с хемоглобина, конкурирайки кислорода.

През последните години, ендогенно образувания CO е доказано, че притежава интересни свойства на сигнална молекула, влияеща върху множество критични клетъчни функции, включително, но не ограничаващи се до възпаление, клетъчна пролиферация и клетъчна смърт. Ерата на газови молекули в биомедицинските изследвания и болести при човека започва с откритието, че отделеният от ендотела клетъчен релаксиращ фактор (EDRF) е идентичен с молекулата на газообразния азотен оксид (NO). Откритието, че ендогенно произведени газови молекули като NO, а сега и CO и H₂S, могат да участват в осъществяването на мощни физиологични и биологични функции, наистина представлява промяна в парадигмата и разкрива нови пътища на интензивно изследване.

Има убедителни доказателства, че CO се освобождава по време на разграждането на хема и че освобождението на CO може да увеличи cGMP. Въпреки това, според установените критерии, един невротрансмитер, наред с други проявени качества, трябва да предава сигнала през синапс. Въпреки че са представени убедителни доказателства за ефекта на CO върху невротрансмисията, той трябва да бъде третиран само като предполагаем, но не като доказан невротрансмитер. Доказано е, че ендогенно произведен CO упражнява биологични ефекти. Ако те са важни физиологични ефекти, може да се предположи, че дефицит на ендогенно генериран CO може да се прояви като болестно състояние или да влоши съществуващи заболявания. Съдовия NO е от значение при поддържане на съдовия тонус и неговият дефицит може да доведе до хипертония или тромбоцитна агрегация. Заболявания, предизвикани от недостиг на хормони или невротрансмитери се облекчават от заместителна терапия. Няма причина да мислим, че екзогенен CO не може да замени дефицит на ендогенен CO. Например, дефицит на ендогенен CO увеличава киселинно-зависимия жлъчен поток, като това може да бъде повлияно и коригирано от екзогенен CO (Shinoda et al., 1998; Suematsu et al., 2000). Механизмите на действие, участието и влиянието върху

модулирането на НАНХ-невротрансмитерите на въглеродния оксид, както и взаимодействието му с други невротрансмитери все още не са достатъчно добре проучени.

II. Цел и задачи

Целта на настоящата работа е изследване ефекта на въглероден оксид (CO) върху моторната активност на изолирани висцерални мускулни препарати. За постигането на целта бяха поставени следните задачи:

1. Индуциране на оксидативен стрес в експериментални животни *in vivo* чрез въздействие с тежки метали
2. Индуциране на оксидативен стрес в гладкомускулни препарати *in vitro* чрез въздействие с водороден пероксид
3. Изследване ефекта на ендогенен въглероден оксид върху съкратителната активност на гладкомускулни препарати от храносмилателната система на морско свинче
4. Изследване ефекта на ендогенен въглероден оксид върху съкратителната активност на гладкомускулни препарати от съдовата система на морско свинче и плъх
5. Изследване взаимодействието между въглероден оксид и азотен оксид във висцерална мускулатура

III. Материали и методи

Експериментите бяха проведени върху нишковидни препарати от фундус на морско свинче, сегменти от тънко черво на морско свинче и сегменти от кръвоносни съдове на морско свинче и плъх. Експерименталните програми са провеждани в съответствие с изискванията на Етичната комисия към Институт по Невробиология - БАН.

III.1. Обекти на изследване

Мъжки полово зрели морски свинчета (200 – 400 g) и плъхове (200 - 250g) бяха умъртвявани чрез зашеметяване (удар по тила), последвано от обезкръвяване или декапитация.

За експериментите със стомашен фундус коремната кухина се отваря по *linea alba*, след което се изважда целият стомах и се поставя във вана с модифициран разтвор на Кребс, като се почиства от съединителна и мастна тъкан. От областта на фундуса се отпрепарират нишковидни гладкомускулни препарати (2mm/15mm, без мукоза) по направление на циркуларния мускулен слой.

За експериментите с тънко черво коремната кухина се отваря по *linea alba*, след което се изважда участък от тънкото черво (5 - 10 cm дължина) на разстояние 10 cm проксимално от илео-цекалния сфинктер. Взетият материал се поставя във вана с модифициран разтвор на Кребс, след което се промива внимателно с разтвор на Кребс и се почиства от съединителна и мастна тъкан. От взетия материал се отпрепарират по 4 сегмента с дължина 10 mm.

За експериментите с кръвоносни съдове се изолират съдови сегменти от базиларна артерия (*a. basilaris*), коронарна артерия (*a. coronaris*) и очна артерия (*a. ophthalmica*), които се поставят за 20 min в леден модифициран разтвор на Кребс.

III.2. Методи на изследване

III.2.1. Метод на индуциране на оксидативен стрес с тежки метали

Мъжки морски свинчета с тегло 400–500 гр. бяха инжектирани подкожно с CoCl_2 , разтворен в 1ml физиологичен разтвор при концентрация 80 mg kg^{-1} , 22–24h преди умървяването. В деня на експериментите, животните бяха умъртвявани чрез зашеметяване (удар по тила), последвано от обезкръвяване. Експресията на NO беше проверена биохимично както в изследваната тъкан, така и в черния дроб за да се гарантира, че процедурата по индуциране на оксидативен стрес е довела до индуциране на NO. Причината за тази допълнителна проверка е липсата на данни за *in vivo* индуциране на NO при морски свинчета.

III.2.2. Метод на индуциране на оксидативен стрес с водороден пероксид (H_2O_2)

В зависимост от експерименталния протокол, оксидативен стрес *in vitro* беше индуциран чрез кумулативно добавяне на H_2O_2 в концентрации 0.1 до 5 mM за 5 минути или чрез еднократно третиране с определените концентрации, 5 минути преди въздействие с полева електрическа стимулация или други субстанции. След трикратно промиване на препаратите с чисти разтвори се възстановяваха контролните отговори.

III.2.3. Имунохистохимичен метод за доказване на Neme oxygenase

За имунохистохимично изследване мъжки морски свинчета (контролни и третирани с $CoCl_2$) бяха умъртвявани както е описано по-горе. Фундусът от стомах беше разделен на няколко парчета и те незабавно бяха фиксирани, като бяха поставяни в 4% параформалдехид и 0,15% пикринова киселина ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), фосфатен буфер (PB), pH 7.3 за 24 часа при температура от 4°C . Някои от парчетата бяха вградени в парафин. Срезове (5 μm дебелина) бяха монтирани върху предметни стъкла покрити с хром стипца, депарафинизирани в xilol, дехидратирани в степенувани серии етанол и измити с $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ фосфатен физиологичен разтвор (PBS). Други парчета бяха измити в захароза (20% разтвор на $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS). Последователни 30 μm дебели срезове от мускулния слой на фундуса бяха изготвени на "Reichert Yung" замразяващ микротом и се събираха в разтвор на захароза. Те бяха измивани многократно в PBS. Свободни депарафинизирани срезове, монтирани върху предметно стъкло, бяха изследвани за HO-1 и HO-2, като се използва процедурата за непряко имунохистохимично оцветяване. Всички инкубации бяха проведени при стайна температура. Срезове бяха третирани с 0,3% H_2O_2 в метанол в продължение на 20 минути и инкубирани с нормален 10%-ен кози серум (NGS) в PBS в продължение на 1 час, изплакнаха се с PBS и след това се инкубираха за една нощ в съответния първичен антисерум. Бяха използвани миши моноклонални анти-HO-1, и заешки поликлонални анти-HO-2 антисеруми (и двата в концентрация 1: 500, разтворен в 1% NGS в PBS). Antimouse IgG-биотин, antirabbit IgG-биотин и streptavidin-HRP бяха прилагани в съответствие със стандартния протокол. Имунореактивността беше онагледена чрез инкубиране на срезове с 0.05% 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemicals Co.) 0,003% H_2O_2 в $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ Tris/HCl буфер с pH 7,56 за 4-8 минути. Някои от срезове бяха негативно оцветени с хематоксилин, обезводнени в етанол и ксилол, монтирани с Entellan, и бяха изследвани под светлинен микроскоп. В контролните групи инкубацията с първичния антисерум не беше

проведена. Резултатите от тези контролни групи бяха отрицателни. Цветните снимки на изследваните проби бяха заснети с цифров фотоапарат, като интензитета на оцветяване в гладкомускулния слой беше анализиран с помощта на Corel Draw софтуер. Данните получени от NO-1 оцветени групи бяха сравнени между третираните и нетретираните животни, след приспадане на фоновото (имунонегативно) оцветяване и представляват средна стойност между 20 различни среза (30 μ m дебелина).

III.2.4. Хистохимичен метод за доказване на NADPH

Редуцираната нукотинамид аденин динуклеотид фосфат-диафороза (NADPH-d) и Ca^{2+} /калмодулин-зависимият ензим NOS участват в образуването на NO чрез превръщането на L-arginine в цитролин. В тази реакция NADPH е ко-субстрат. Така че, NOS-съдържащите структури могат морфологично да се визуализират чрез хистохимична техника за оцветяване на NADPH-d.

Препаратите за изследване на NADPH-диафороза са промивани за 30 min в 0.1 M Tris-HCl буфер с pH 7.4 и 0.8% Triton X-100, след което са инкубирани за 120 min при температура 37°C в 10 ml 0.1 M Tris-HCl буфер с pH 7.4, съдържащ 65.4 mg редуциран β -NADP и 10 mg nitroblue tetrazolium. Контролните препарати са инкубирани без субстрат или електронен акцептор, при което не се визуализира диафоразната реакция.

След края на реакциите срезовете са промивани в PBS, монтирани върху хром-желатинирани предметни стъкла, изсушени на въздух за 24 h, дехидрирани чрез възходяща редица алкохоли, просветлени с ксилол покривани с покривни стъкла с Entellan.

За микроскопските изследвания е използвано следното оборудване: светлинен микроскоп Jenaval (Germany) и светлинен микроскоп Nikon и дигитална камера Coolpix 4.500, Nikon (Japan). Фотодокументацията е съхранена в TIF формат и оптимизирана за контраст и яркост със софтуерна програма Adobe PhotoShop CS3.

III.2.5. Метод за регистриране на съкратителна активност на гладкомускулни препарати.

Гладкомускулните препарати се монтираха вертикално в термостатирани органични вани с обем 10 ml (Схема 1), съдържащи модифициран разтвор на Krebs (pH 7.4) без $CaCl_2$ (за пълна релаксация), който се аерираше непрекъснато с газова смес (95% O_2 , 5% CO_2). Във всяка вана се монтираше по една нишка.

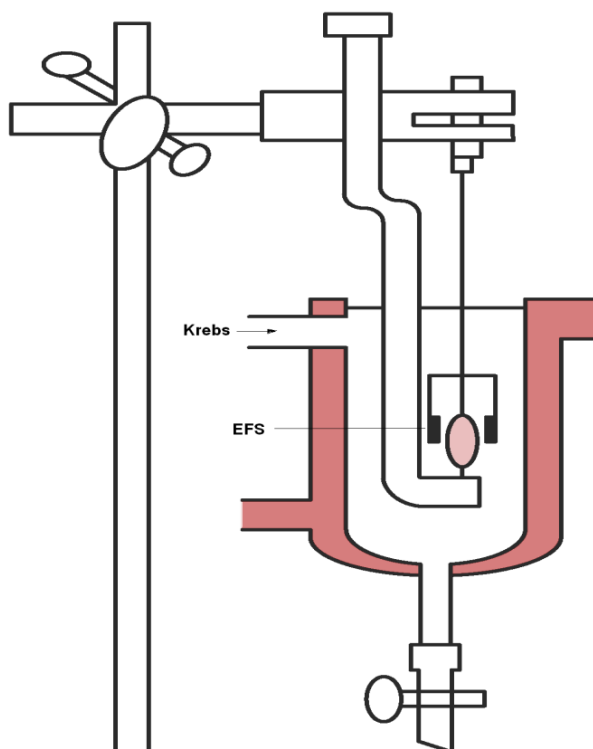


Схема 1. Схема на органна вана за изследване на електрически-предизвикани моторни отговори.

Съкратителната активност на гладкомускулните препарати се регистрираше изометрично с помощта на тензометрични датчици, свързани чрез тензометричен мост (Microtechna 1000, Чехия) с пишешо устройство (TZ 4620, Чехия). Част от експерименталните данни се регистрираха с компютризирана *on-line* система и се записваха чрез компютърна програма (Tenzo, България). Тридесет минути след монтиране във ваните, хранителният разтвор без CaCl_2 се сменяше с разтвор, съдържащ 2.5mM CaCl_2 . След стабилизиране на тензията препаратите бяха натоварвани с тежест еквивалентна на сила 10 mN , след което бяха адаптирани в продължение на 60 min . В този период работният разтвор във ваните се сменяше с пресен аериран разтвор на всеки 20 min . Беше използвана електрическа полева стимулация (ЕПС) чрез два успоредни платинови електрода на разстояние 2.5 mm от препаратите, със следните параметри на стимулите: правоъгълни импулси с продължителност 1 ms , напрежение 50V , 20 s продължителност на стимулацията, честота 2 Hz и 5 Hz . Интервалът между различните честоти беше 3 min през 30 min . Неврогенно-независимият тонус беше отчитан в присъствието на TTX ($1\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$), а индуцираният от ЕПС – в присъствие на atropine ($1\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) върху индуциран с $\text{PGF}2\alpha$ тонус, тип - плато. Моторните отговори на гладкомускулните препарати бяха

изчислявани като процент от максималния тонус след смяна на разтвора с CaCl₂ и базалното ниво на тонуса при отсъствие на CaCl₂.

III.2.6. Метод за изолиране на *a. coronaris*.

Сърцето беше експлантирано в рамките на 2 min тялото на лабораторното животно след умъртвяването му. Под бинокулярна лупа беше фиксирано и внимателно беше отстранявано дясното предсърдие. *A. coronaris* заедно с част от съединителната тъкан, първо внимателно беше дисектирана от сърцето на границата между предсърдието и камерата. След това съединителната тъкан беше отстранявана с помощта на фини ножици и пинцети, до получаване на изчистен кръвоносен съд. Отпрепарираната артерия се съхраняваше в леден PSS-разтвор за съхранение на съдове за 20 min. След този период сегменти *a. coronaris* се монтираха на жичковия миограф.

III.2.7. Метод за изолиране на *a. basilaris*

В рамките на 10 min след умъртвяването му, от черепа на лабораторното животно беше екстирпиран мозък. За целта след отстраняване на теменните кости, мозъкът внимателно беше повдиган с шпатула във фронталната му част с цел прерязване на черепно-мозъчните нерви и *n. opticus*. Целта беше да се предпазят от увреждане мозъчните обвивки в основата на мозъка, като по този начин се предпазваше и намиращата се там *a. basilaris*. Под бинокулярна лупа съответните мозъчни обвивки се отстраняваха и *a. basilaris* внимателно се дисектиреше от основата на мозъка с помощта на фини ножици и пинцети. След това отпрепарираната *a. basilaris* се съхраняваше в леден PSS-разтвор за съхранение на съдове за 20 min. След този период сегменти артерията се монтираха на жичковия миограф.

III.2.8. Метод за изолиране на *a. ophthalmica*.

Лява и дясна очна ябълки (между експериментите те се изследваха в случаен порядък) бяха екстирпирани в рамките на 5 min от черепа на лабораторното животно след умъртвяването му. Под бинокулярна лупа съответните *a. ophthalmica* заедно с част от съединителната тъкан първо внимателно се дисектираха от очната ябълка и *n. opticus*. След това съединителната тъкан беше отстранявана с помощта на фини ножици и пинцети, до получаване на изчистен кръвоносен съд. Отпрепарираните артерии се съхраняваха в PSS-разтвор за съхранение на съдове за 20 min. След този период сегменти от тези съдове се монтираха на жичковия миограф. Всички манипулации със съдовите сегменти се извършваха в ледени разтвори с цел намаляване негативните ефекти от физическите манипулации с тъканите.

III.2.9. Метод за регистриране на съкратителна активност на съдови сегменти.

Монтиране на съдовите препарати

Артериалните съдови сегменти с дължина 1.8 – 2 mm, след като бяха дисектирани свободни от обкръжаващите ги тъкани (мастна и съединителна), бяха монтирани върху две жички от неръждаема стомана с дебелина 40 μm в разтвор със същия състав като този, в който бяха изолирани. Монтираните препарати бяха прикрепени с винтове за стоманени челюсти в органна ваничка с контролиран обем на жичков миограф (model 300A, JP Trading, Denmark) (**Схема 2**), съдържаща модифициран разтвор на Кребс (PSS за съкратителни изследвания) с рН 7.4, който се аерира непрекъснато с газова смес (95% O_2 , 5% CO_2). Едната челюст е свързана с микрометър, който нагласява разстоянието между двете жички, а втората жичка се монтира на втора челюст, свързана с пиезоелектричен тензометричен датчик. Накрая съединително-тъканни и мастни остатъци около съда бяха внимателно отстранявани с помощта на фини ножичка и пинсети. Процедурата по дисецирането на артериалните препарати и монтирането на сегментите на апарата продължаваше средно 1 час (Mulvany, 1977) и протичаше при температура на работните разтвори 2 - 4°C.



Схема 2. Схема на експериментална постановка за регистриране на изометрично съкращение на малки съдове с жичков миограф (model 300A, JP Trading, Denmark).

При експериментите с деендотелизирани препарати, ендотелът се отстраняваше с помощта на косъм от мустак на плъх чрез внимателно итралуменно остъргване.

След това работният разтвор във ваничката се сменяше с такъв с концентрация на CaCl_2 2.5 mM или 1.5 mM в зависимост от изследвания съд.

Нормализация

Монтиран, съдът се оставя да се еквилибрира във ваничката за 30 min в среда на PSS със същия състав като разтвора за изолиране и монтиране на препаратите и 2.5 mM CaCl₂ при 37°C, и непрекъснато аериране с карбоген (95% O₂ и 5% CO₂). След 30 min еквилибрационен период, съдовият препарат беше нормализиран до пасивна тензия еквивалентна на тази, която е необходима да продуцира 90% от техния диаметър (диаметър D₁₀₀), когато съдът е изложен на презстенно налягане от 100 mmHg (Mulvany & Halpern, 1977).

По същество, процедурата по нормализация представлява следното: намирайки се в началото в напълно ненатоварено състояние, препаратите бяха инкрементно разтягати чрез раздалечаване на двете жички, на които беше монтиран артериалния съд. Всяка стъпка на разтягане продуцираше увеличаване на тензията, както и в такова състояние съдовете пребиваваха около 100-120 sec, през което време съдовете след бързо и кратко съкращение достигаха стабилно ниво на тензията. Този процес беше повтарян толкова пъти, колкото бе необходимо да се достигне такова разтягане на съдовете, което да генерира стойност на тензията еквивалентна на 90% от пасивния диаметър и при този диаметър ефективното налягане е 13,3 kPa (100mm Hg) (Mulvany & Halpern, 1977; Hudson et al., 2007). Нормализационната процедура отчита разликите в дължината и диаметъра на сегментите, като по този начин позволява да се изследват различните съдове при идентични условия на вътресъдови налягания, които са много близки до тези в интактни биологични обекти (Shirasawa et al. 2003).

След нормализацията съдовите сегменти се инкубират около 30 min преди същинската експериментална процедура.

Във всеки експеримент се тестваха виталността на препарата и наличието на интактен ендотел. Първото се осъществяваше чрез последователни приложения PSS за преконтрахиране на съдови сегменти в началото на експеримента след нормализационната процедура. Присъствието на функционално интактен ендотел се проверяваше чрез ацетилхолин-предизвикана релаксация (Ach) (10⁻⁵M), приложен върху платото на 125mM K⁺- предизвиканото съкращение.

Видовете препарати, обособени в четири групи в зависимост от наличието на интактен ендотел и/или невронална регулация, бяха както следва: 1) нативни (с интактни ендотел и неврони); 2) с отстранен ендотел; 3) с нативен ендотел и тетродотоксин-третиран неврони (периваскуларните неврони бяха с блокирана

пропагация на акционни потенциали от този инхибитор на Na-каналите); и 4) деендотелизирани и тетродотоксин-третиранни препарати.

III.3. Статистическа обработка на експерименталните резултати.

Получените експериментални данни бяха обработени по метода на вариационния анализ ANOVA. Резултати са представени като средни аритметични стойности, получени от препарати, изолирани от отделни експериментални животни. Изчислявани бяха също стандартната грешка (\pm S.E.M.) на средната аритметична стойност. Статистическата достоверност при сравняване на средните стойности се определяше по Student's test и Tukey-Kramer Multiple Comparison test за чифтни и групови данни при статистическа достоверност $P < 0.05$. При статистическата обработка на данните, построяването на графиките и цялостното оформление на фигурите бяха използвани компютърните програми "GraphPad InStat" v2.04 и v3.02, "Origin Pro 7.5 PRO", "Corel Draw" и "MyoData" v2.02.

III.4. Разтвори и субстанции

IV.4.1. За изследване на стомашно-чревния тракт

За изследване съкратителната активност на препарати изолирани от стомашно-чревния тракт беше използван модифициран разтвор на Кребс със състав (в mM): NaCl 110, KCl 6.00, NaH_2PO_3 1.2, NaH_2CO_3 2.5, KH_2PO_4 1.19, MgCl_2 1.2, CaCl_2 2.5, glucose 11.5.

IV.4.2. За изследване на съдове

За изследване съкратителната активност на съдови препарати бяха използвани три разновидности на модифициран разтвор на Кребс с различен състав (в mM):

- За изолиране и монтиране на съдови сегменти – NaCl 112.5, KCl 4.75, NaH_2CO_3 25.00, KH_2PO_4 1.19, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.8, CaCl_2 0.00 или 0.16, glucose 11.5. Липсата на CaCl_2 в разтвора е необходимо за да се осигури отпуснато (дилатирано) състояние на съдовата мускулатура. По този начин се минимизира механичното травмиране на артериалната стена по време на препараторните процедури (Hesselund, 2003)
- За съхраняване на съдови сегменти – NaCl 118, KCl 5, CaCl_2 2.5, glucose 11.5, Taurine 10, Piruvic acid 5, HEPES 25 (pH 7.4÷7.5).
- PSS за съкратителни изследвания – тези разтвори бяха с различен състав в зависимост от изследваните кръвоносни съдове, както следва:

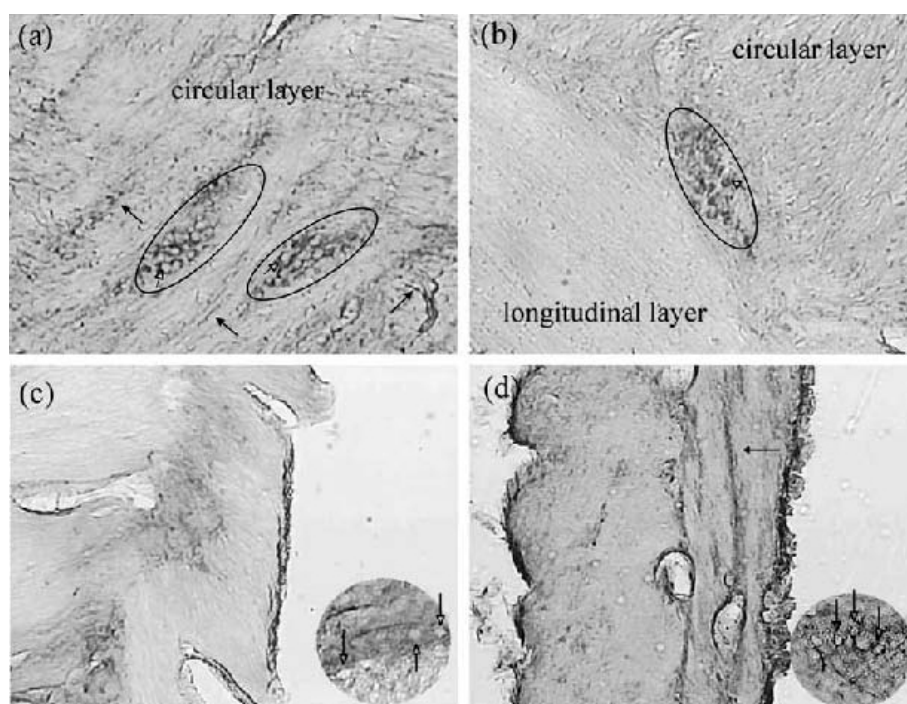
- За преконтрахиране на съдови сегменти - KCl 125, MgSO₄·7H₂O 1.8, NaH₂CO₃ 25.00, KH₂PO₄ 1.19, EDTA 0.03, CaCl₂ 2.5, glucose 5.5.
- За коронарни съдове - NaCl 110, KCl 6, MgSO₄·7H₂O 1.2, NaH₂CO₃ 25.00, KH₂PO₄ 1.19, EDTA 0.03, CaCl₂ 2.5, glucose 5.5.
- За *a. basilaris* – NaCl 112.5, KCl 3.5, MgSO₄·7H₂O 1.2, NaH₂CO₃ 25.00, KH₂PO₄ 1.19, EDTA 0.03, CaCl₂ 1.5, glucose 5.5.
- За *a. ophthalmica* - NaCl 112.5, KCl 4.75, MgSO₄·7H₂O 1.2 , NaH₂CO₃ 25.00, KH₂PO₄ 0.19, EDTA 0.03, CaCl₂ 2.5, glucose 5.5.

IV. Резултати и обсъждане

IV.1. Участие на ендогенния въглероден оксид в реализиране на съкратителен отговор при гладко-мускулни препарати от фундус на стомах.

IV.1.1. Имунохистохимично доказване наличието на НО във фундус на стомах.

Беше проведено имунохистохимично локализиране на НО-1 и НО-2 в миентерични ганглии, интермодални направления и в мускулните слоеве.



Фиг. 1. Имунохистохимично оцветяване за наличие на НО-1 и НО-2. Имунохистохимично оцветени 30 μm дебели срезове от стомашен фундус на морско свинче за НО-2 (а и б) и НО-1 (с и д). В (а) и (с) – нетретиран животни. В (б) и (д) – третираните животни. Кръгове в (а) и (б) маркира миентерични ганглии. В (а) и (д) плътните стрелки показват наличието на имунопозитивни варикозности в гладкомускулната стена между маркираните ганглии. Отворените стрелки показват имунореактивни тела на нервните клетки в миентеричните ганглии.

Имунохистохимията извършена с поликлонални антитела-2 за НО, показва ниско, но измеримо присъствие на НО-2 в гладка мускулна тъкан, което се изразява в единно вътреклетъчно разпределение на петна, които не показват разлика между третиран и нетретиран животни (Фиг. 1а, б). НО-2 специфично оцветяване е по-силно изразено в зоните, включващи циркуларния слой, в сравнение с лонгитудиналния (Фиг. 1б). В третираните животни значими промени бяха наблюдавани при оцветяване за НО-1 между фона и областите, включващи гладкомускулния слой на стената. Имаше също така значителни промени в интензивността на оцветяване НО-1, между третираните и нетретиран животни (Фиг. 1с, д). Установено бе, че НО-1 се експресира в гладкомускулния слой на стомашния фундус след въвеждането на CoCl_2 .

Имунореактивността за НО-2 се наблюдаваше и в телата на нервните клетки на миентеричния сплит (**Фиг. 10a, b**). С помощта на контрастиране с хематоксилин, отрицателните и имунопозитивните неврони бяха преброени в последователни срезове и беше изчислен относителният дял на имунопозитивните / имунонегативни неврони. Около 35% от невронните тела в миентеричния сплит са НО-2-имунопозитивни. Имунореактивни нервни влакна присъстват в нервните връзки с различни диаметри между мускулните влакна. Имунопозитивни нервни влакна бяха наблюдавани по-често в циркуларния, отколкото в лонгитудиналния мускулен слой. Не имунореактивни невронните тела за НО-1, бяха наблюдавани в миентерични ганглии на двете групи - третирани и нетретирани морски свинчета. Въпреки това, при третираните животни имунопозитивни нервни влакна бяха наблюдавани в нервните пътища (**Фиг. 1d**) и по нервните връзки, успоредни на мускулните слоеве.

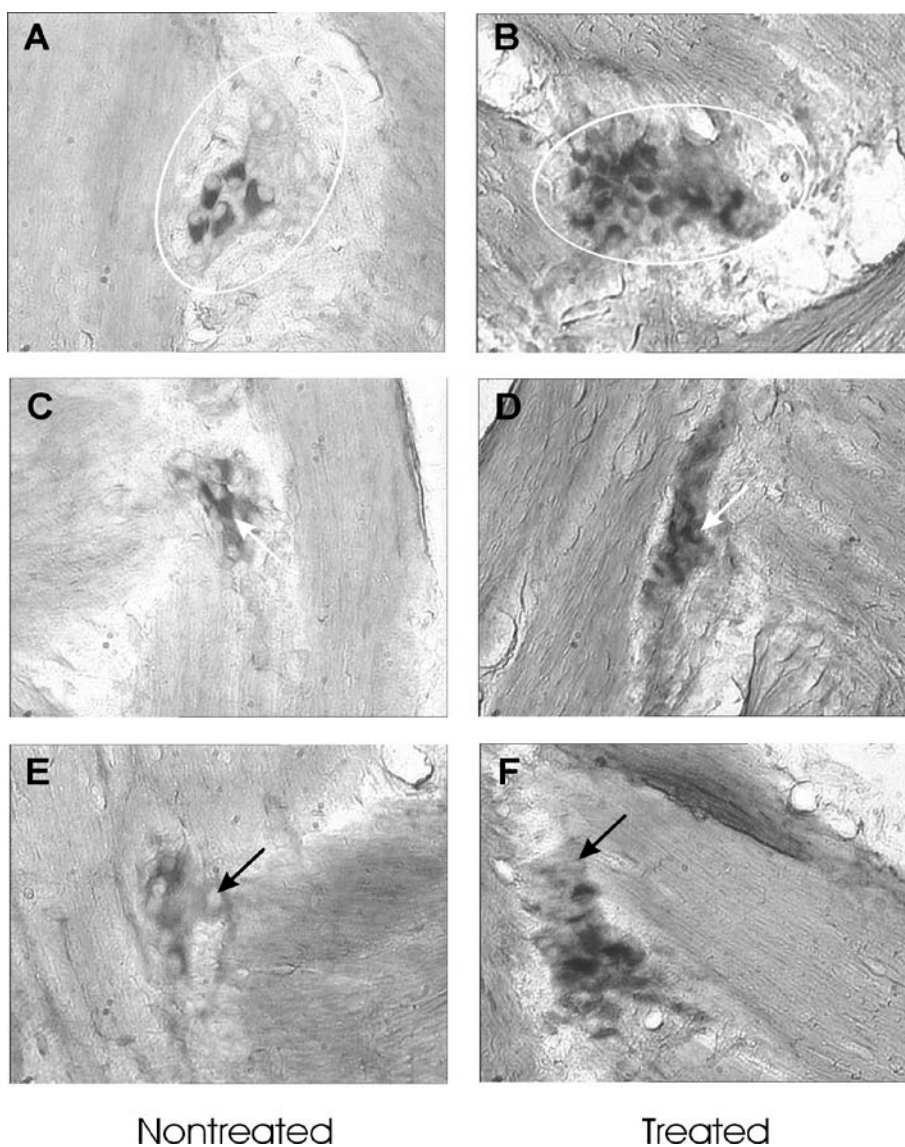
Тези резултати показват, че НО-2 е конституционално присъстваща в миентерични неврони от морски свинчета и НО-1 може да се експресира в невронните елементи инервиращи гладката мускулна тъкан на стомаха, в резултат на *in vivo* индукция с CoCl_2 . От липсата на позитивно оцветяване за НО-1 в клетъчните тела на миентерични неврони може да се предположи, че НО-1 се транспортира от клетъчното тяло по дължината на нервното влакно в посока на ефекторната тъкан незабавно след неговата синтеза. Фактът, че присъствието на НО-2 в невронални клетъчни тела беше по-слабо изразено в третирани с CoCl_2 животни може да се интерпретира в посока, че външни фактори като тежки метали могат да повлияват транспорта на НО по дължината на аксона към крайните проекционни места.

Представените имунохистохимични изследвания показват за първи път присъствие на НО-2 в гладкомускулни клетки и невронални клетъчни тела във фундус на стомах при еспериментален модел от морско свинче. Наблюденията за експресия на НО-2 в невронните елементи инервиращи гладката мускулна тъкан на стомаха дават доказателство за функционална индукция на НО-1 в нервните терминали и поставят начало на дебата за ролята на СО в регулиране на съкратителната активност на висцералните гладки мускули.

IV.1.2. Хистохимично доказване наличието на NADPH във фундус на стомах.

При нетретираните животни имунохистохимичните изследвания показаха наличие на NADPH-d-положителни неврони (**Фиг. 2**).

Оцветяването беше в единични неврони от ганглиите на миентеричния плексус. В гладко-мускулната тъкан оцветяването беше слабо. При третиран животни преобладаваща част от невроните в миентеричните ганглии на стомашен фундус бяха NADPH-позитивни, като оцветяването е главно на телата на невроните, а нервните пътища не бяха оцветени. Гладко-мускулните тъкани също бяха интензивно оцветени, което показва наличието на голямо количество NADPH-d в тези тъкани.



Фиг. 2. Хистохимично оцветяване за наличие на NADPH във фундус от стомах на морско свинче. **A, C, E** - оцветяване в срезове от нетретиран с CoCl_2 животни; **B, D, F** - оцветяване в срезове от третиран с CoCl_2 животни. Ясно се различават миентеричните ганглии - оградените области на **A** и **B**; със светли стрелки са означени имунопозитивните неврони (**B** и **C**); с тъмни стрелки са означени имунонегативни неврони (**E** и **F**)

Наличието на позитивни за NADPH-d неврони в тъканите на третиран с CoCl_2 експериментални животни показва, че NOS, както и NO се повлиява от състояния на

оксидативен стрес и е дават доказателство за функционална индукция на NOS при този експериментален модел.

Наличието както на имунопозитивни неврони за NO, така и на позитивни за NADPH-d неврони в миентеричните ганглии предполага, че продуктите от ензимната им дейност, съответно ендогенен CO и NO, ще се отделят в идентични структури. Тази колокализация позволява да се спекулира с твърдението, че ендогенният CO и NO взаимодействат във фундус от стомах на морско свинче. Подобно взаимодействие, но при различни обекти е показано в ренални артериоли (Botros a. Navar, 2006), ренални артерии (Stone a. Marletta, 1994; Levonen et al., 2001), където двата газови невротрансмитера могат да активират sGC за да повишат нивата cGMP и предизвикат вазодилатация. Освен това е известно, че ниски нива на CO (0.001 до 0.1 $\mu\text{mol/L}$) могат да стимулират освобождаване на NO, докато високи нива на CO ($\geq 1 \mu\text{mol/L}$) инхибират NOS (Thorup et al., 1999). Също така свръхекспресия на съдово-специфичната NO-1 в гладката мускулатура намалява NO-медирана вазодилатация, и причинява хипертония (Imai et al., 2001).

За наше съжаление няхаме възможност да изследваме използваните от нас обекти едновременно за наличие/отсъствие на индукция на NO и NOS при модел на индуциран с CoCl_2 оксидативен стрес. Такова изследване би осветлило по-добре въпроса за колокализацията на двете ензимни системи в стомашен фундус, както и функционалното взаимодействие между двата газови невротрансмитера.

IV.1.3. Влияние на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на циркуларни гладкомускулни препарати от фундус на морско свинче – резултати и дискусия.

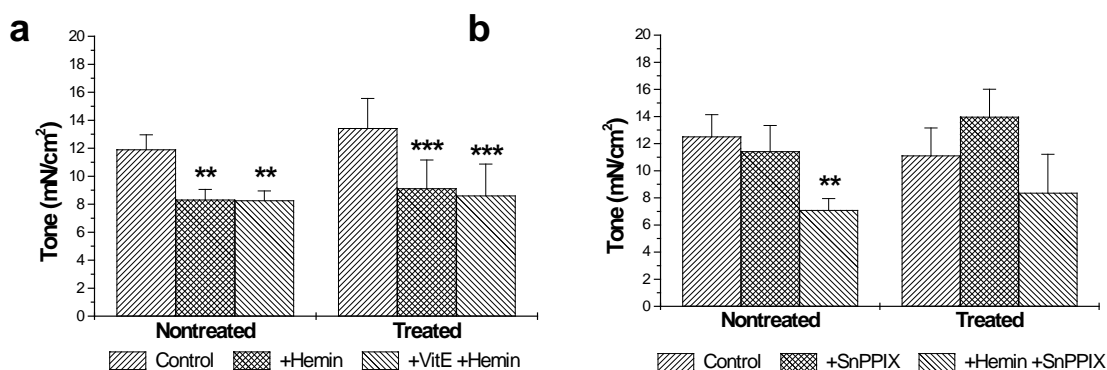
Влиянието на ендогенния въглероден оксид беше изследвано чрез три различни експериментални протокола. При първият беше оценен ефекта на haemin ($10 \mu\text{M.L}^{-1}$) върху спонтанния тонус в присъствието на tetrodotoxin (TTX) ($1 \mu\text{M.L}^{-1}$), прибавен за блокиране освобождаването на невротрансмитерите от интрамуралните неврони. При втория беше изследвано въздействието на haemin и SnPPIX върху Prostaglandin-F 2α (PGF 2α) предизвикания тонус. В третия протокол на фона на PGF 2α -индуциран тонус бяха насложени електрически евокирани стимули (EFS). Ефектите от haemin и SnPPIX бяха оценявани по амплитудата на EFS-предизвиканите релаксации за отчитане на ролята на haemin в невrogenните отговори. В някои от експериментите hemin беше

прилаган след Vitamin E добавян в разтвора, който беше използван за неутрализиране на свободни радикали.

Неврогенно-зависимият отговор на фундуса на стомаха на морско свинче се състои от acetylcholine-зависима съкратителна компонента (блокираща се от атропин), както и релаксаторна компонента, която се смята, че зависи от освобождаването на NO (при стимулация с честоти под 10 Hz) и вазоактивния интестинален полипептид VIP (при стимулиране на честоти над 10 Hz). По този начин, при стимулиране с честоти между 1 и 5 Hz, NO е най-вероятно основният релаксаторен невротрансмитер, освободен при EFS в тази тъкан (Sotirov et al. 1999 г.; Sotirov & Papasova 2000 г.). Ето защо беше преценено да се използват две честоти на стимулация в диапазон 1 - 5 Hz, имайки предвид, че като газови молекули подобно на NO, освобождаването на CO, ако има такава, може да се очаква да стане в този честотен обхват, в който CO ще бъде способен да действа като евентуален релаксаторен невротрансмитер.

Ефекти върху спонтанния и PGF2 α -индуцирания тонус.

Haemin не се отрази на спонтанния тонус в присъствието на TTX в двете групи - третиран и нетретиран животни (n=10 за третиран и нетретиран животни). И в двете групи haemin (10 μ M/l), причини статистически значимо намаление на PGF2 α -индуцирания тонус (Фиг. 3а).



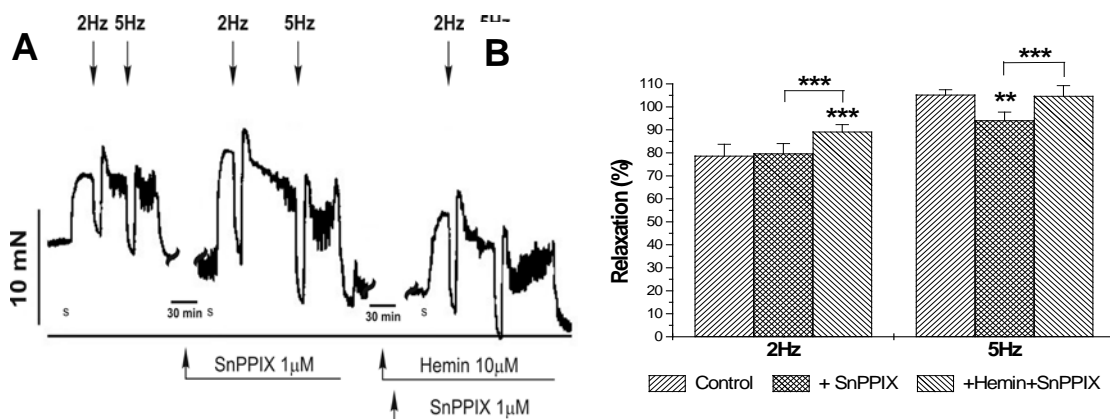
Фиг. 3. Влияние на hemin (10 μ M/l) върху PGF2 α -индуцирания тонус. Отговорите на препаратите са регистрирани в присъствието на атропин (1 μ mol.L $^{-1}$); (** P < 0.01, *** P < 0.001).

Наблюдаваното намаление на тонуса след hemin не се повлия в значителна степен от наличието на Vit.E в разтвора (P > 0.05, n=5 третиран и нетретиран животни), или от освобождаването на NO. Това намаляване продължава да съществува дори и в присъствието на 100 μ M L-NNA. И в двете групи, третиран и нетретиран животни, SnPPIX (1 μ M.L $^{-1}$) не показва значително въздействие върху PGF2 α -предизвикания

тонус, но се премахва релаксиращото действие на hemin (n=18 за нетретирани животни; n=12 за третирани животни). Въпреки това, инкубиране на препаратите с hemin 10 минути преди прилагането на SnPPIX все още водеше до намаляване на тонуса, което е статистически значимо при нетретирани, но не и при третирани с CoCl₂ опитни животни (Фиг. 3b). По-висока концентрация на SnPPIX (30 μM.L⁻¹) напълно премахва hemin-индуцираното намаляване на тонуса. Несъществени разлики се наблюдаваха в релаксаторното действие на hemin върху PGF2α-индуцирания тонус между третирани и нетретирани животни (n=12 за нетретирани и n=14 за третирани с CoCl₂ морски свинчета; P> 0.05).

Ефекти върху електрически предизвиканите релаксации.

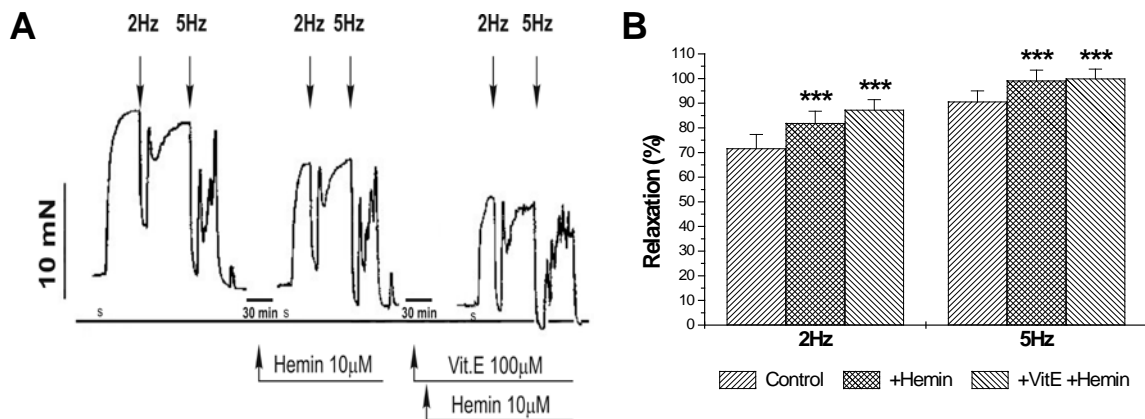
При нетретирани морски свинчета hemin влияе върху електрически предизвиканите релаксации при честоти от 2 и 5 Hz. SnPPIX (1 μM.L⁻¹) има значително въздействие само върху EFS-евокирани релаксации при 2Hz стимулиране. Добавянето на SnPPIX 10 минути след прилагането на hemin доведе до значително увеличение на релаксаторния отговор, който е сравним с този при липсата на SnPPIX (Фиг. 4a). При 5 Hz същата концентрация на SnPPIX (1 μM.L⁻¹), доведе до статистически значимо намаление на релаксаторния отговор на гладкомускулната тъкан.



Фиг. 4. Ефект на SnPPIX (1 μmol.L⁻¹) върху EFS-евокираната релаксация на цикларни нишки от стомашен фундус при нетретирани морски свинчета. (A). Оригинален запис: Горизонтална линия - "нулев" тонус, измерен в работен разтвор без Ca²⁺; със стрелка е отбелязано добавянето на PGF2α (0.5 μmol.L⁻¹) за предизвикване покачване на тонуса. Инкубиране с SnPPIX за 20 min, с hemin - 10 min преди прилагането на SnPPIX. Отговорите на нишките към EFS са регистрирани в присъствието на атропин (1 μmol.L⁻¹). (B) Релаксаторен отговор за 2 Hz (n=8) и 5 Hz (n=8) стимулация. Данните са средни ± SEM (** P <0.01, *** P <0.001).

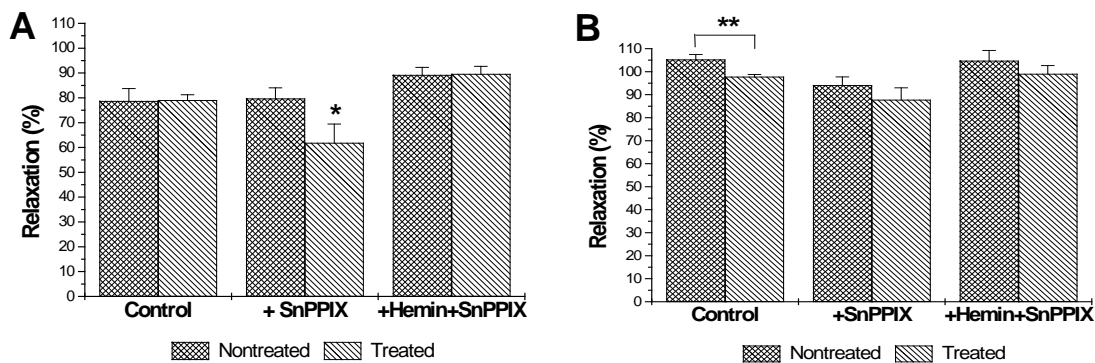
Добавянето на hemin 10 мин преди прилагането на SnPPIX в разтвора, доведе до възстановяване на контролната амплитуда на релаксаторния отговор при EFS (Фиг. 4b). В присъствието на SnPPIX (1 μM.L⁻¹), добавен в разтвора 20 минути преди

въвеждането на haemin ($10 \mu\text{M.L}^{-1}$) за увеличаване на ефекта от hemin, EFS-вокираните релаксации бяха напълно премахнати и при двете честоти на стимулация.



Фиг. 5. Ефект на hemin ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) върху EFS-евокираната релаксация на цикларни нишки от стомашен фундус при нетретиранни морски свинчета. **(A).** Оригинален запис: Горизонтална линия - "нулев" тонус, измерен в работен разтвор без Ca^{2+} ; със стрелка е отбелязано добавянето на $\text{PGF2}\alpha$ ($0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) за предизвикване покачване на тонуса. Инкубиране с hemin за 20 min, с Vit. E - 10 min преди прилагането на hemin. Отговорите на нишките към EFS са регистрирани в присъствието на атропин ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$). **(B)** Релаксаторен отговор за 2 Hz ($n=12$) и 5 Hz ($n=12$) стимулация. Данните са средни \pm SEM (***) $P < 0.001$).

Hemin, приложен самостоятелно, предизвика статистически значимо увеличение на релаксаторния отговор и при двете честоти (2 и 5 Hz) EFS-предизвикана стимулация на препаратите (**Фиг. 5a**). Ефектът на hemin не зависи от наличието на Vit E (**Фиг. 5b**).



Фиг. 6. Ефект на SnPPIX ($30 \mu\text{mol.L}^{-1}$) върху ПЕС-предизвикана релаксация при третиранни и нетретиранни животни. **A** - 2 Hz ($n=5$); **B** - 5 Hz ($n=5$). Данните са средни \pm SEM (** $P < 0.01$, * $p < 0.05$).

При третиранни морски свинчета SnPPIX ($1 \mu\text{M.L}^{-1}$) доведе до статистически значимо намаляване на EFS-предизвиканата релаксация при използваните честоти (**Фиг. 6a**). Прилагането на SnPPIX ($1 \mu\text{M.L}^{-1}$) на фона на haemin доведе до възстановяване на амплитудите на релаксаторния отговор на тъканите обратно до контролните им стойности ($n = 8$, $P < 0.01$ на 2 Hz; $n = 9$, $P < 0.05$ при 5 Hz).

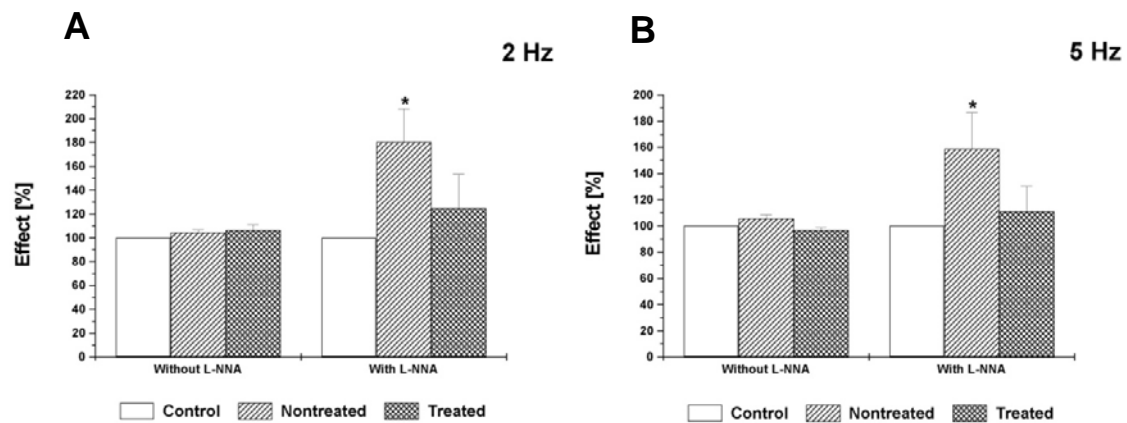
И при двата протокола на стимулация hemin, когато се прилага самостоятелно или в комбинация с Vit. E, причини увеличаване на EFS-предизвикания релаксаторен отговор, който е статистически значим при 5 Hz стимулация ($n = 12$, $P < 0,001$) (**Фиг. 6b**). Не са установени значими разлики в релаксаторния отговор на тъканта при 2 Hz стимулация между третирани и нетретирани животни. Въпреки това, при 5 Hz стимулация на амплитудите на релаксаторните отговори в контрола са значително намалени при третираните животни в сравнение с нетретирани такива (**Таблица 1**). От друга страна, SnPPIX подтиска релаксаторния отговор на препаратите към EFS много по-ефективно при третираните животни (**Таблица 1**). Тези данни показват, че активността на NO е по-висока в нервните окончания на третираните животни, но способността на тъканите да релаксират в отговор на NANC стимулация по някакъв начин намалява.

Взаимодействие между CO и NO в стомашен фундус от морско свинче.

Претретирането с PGF₂ α на препаратите от фундус на нетретирани с CoCl₂ животни в присъствието на atropine (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) и L-NNA (0.1 mmol.L^{-1}) доведе до повишаване на мускулния тонус. След неговото стабилизиране беше приложена ЕПС с честота 2Hz и 5Hz, всяка с продължителност по 30 сек. След първата стимулация беше изчаквано повторното стабилизиране на мускулния тонус (**Фиг. 7a**).

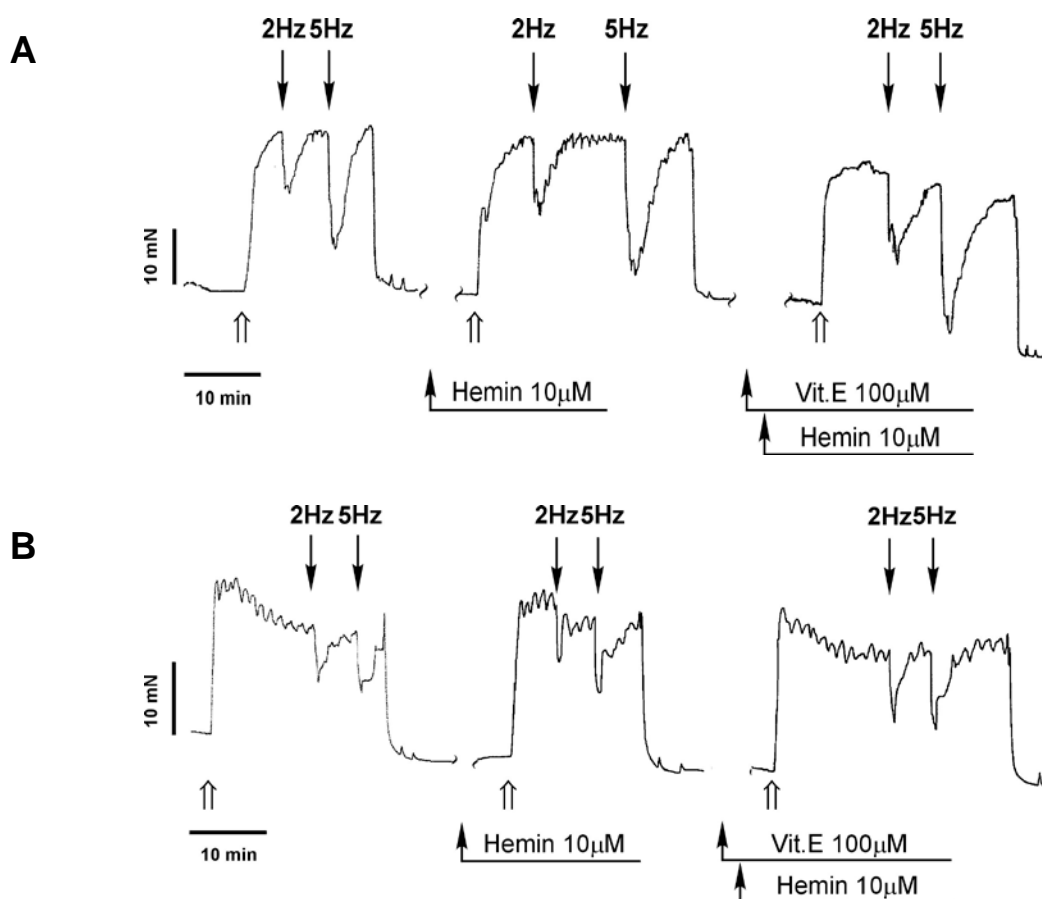
Третирането на опитните животни с CoCl₂ не оказва влияние върху спонтанната съкратителна активност и тонуса на препаратите. При повишаването на тонуса на препаратите в присъствие на atropine (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) и L-NNA (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) преди електрическа стимулация се отчита по-дълго време, необходимо за стабилизиране на тонуса след P_gF₂ α , нестабилност, както и промяна на конфигурацията на релаксаторния отговор (**Фиг. 7b**). След относителното стабилизиране на мускулния тонус беше приложена EFS с честота 2Hz и 5Hz, всяка с продължителност по 30s. След края на първата стимулация беше изчаквано повторното стабилизиране на мускулния тонус.

При нетретирани животни блокирането на NOS доведе до увеличаване със 76% на ефекта на Hemin върху EFS-предизвикания отговор при честота на стимулация 2Hz (**Фиг. 7**). При третираните с CoCl₂ животни hemin има ефект върху релаксаторния отговор само при ниската честота на стимулация – 2Hz, като блокирането на NOS увеличава неговия ефект с 18%.



Фиг. 7. Ефект на Nemin ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) върху ЕПС-предизвикана релаксация при третирани и нетретирани животни в отсъствие и присъствие на L-NNA. **A** - 2 Hz (n=5); **B** - 5 Hz (n=5). Данните са средни \pm SEM (* $p < 0.05$).

При нетретираниите животни наличието на VitE в разтвора редуцира ефекта на Nemin до 49%. При 5Hz увеличението на ефекта на Nemin е с 51%, а наличието на VitE го редуцира до 41%. Наличието на VitE в разтвора при третираниите с CoCl_2 животни, обаче, повишава ефектът на Nemin до 61%.



Фиг. 8. Оригинални експериментални записи показващи ефекта на hemin ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) върху ЕПС-предизвиканата релаксация при ГМП от фундус на нетретирани **(А)** и третирани **(В)** морски свинчета. Със стрелка е отбелязано добавянето на $\text{PGF2}\alpha$ ($0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) за предизвикване покачване на тонуса. Инкубиране с hemin за 20 min, с Vit. E - 10 min преди прилагането на hemin. Отговорите на нишките към EFS са регистрирани в присъствието на атропин ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Блокирането на NOS води до премахване ефекта на SnPPIX (**Таблица 1**). Претретирането с hemin преди SnPPIX увеличава амплитудата на релаксаторния отговор. При 5Hz блокирането на NOS не оказва съществено влияние върху ефекта на SnPPIX. От друга страна блокирането на NOS води до намаляване ефекта на SnPPIX с 23% (± 7) (**Таблица 1**). Наличието на Hemin води до намаляване с 34% ефекта на SnPPIX. При високата честота на стимулация (5 Hz) блокирането не оказва съществено влияние върху ефекта на SnPPIX.

	Effect (%)			
	Nontreated animals		Treated animals	
	2Hz	5Hz	2Hz	5Hz
SnPPIX	*85.36 (±9.42)	95.52 (±5.15)	99.61 (±16.23)	105.08 (±10.41)
Hemin + SnPPIX	91.19 (±11.9)	*110.25 (±2.73)	*134.63 (±20.05)	107.68 (±16.16)

Таблица. 1. Ефект на SnPPIX (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) сам и в присъствие на hemin (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) върху ПЕС-предизвиканата релаксация при нетретирани (n=5) и третирани (n=5) морски свинчета; (* p<0.05 vs control).

През 1999г. Foresti a. Moterlini предложиха схема за взаимодействие между двете ензимни системи (CO/HO и NO/NOS) за регулация на индукцията и активността на HO-1 от NOS и NO. В нашите изследвания въздействието, което отделеният при електрическа стимулация NO оказва, не може да се обясни с въздействие върху експресията на HO-1. От друга страна този ефект е различен при нетретирани животни, т.е. повлиява се и конститутивната изоформа на ензима – HO-2. Също така, блокирането на NOS при третирани животни не довежда до съществени разлики в ефекта на hemin, респективно на ендогенния CO, върху релаксацията на изолирани препарати. Това косвено показва намалено ниво на NOS при третирани животни, което подсказва възможността въздействието с тежки метали да оказва негативно влияние върху експресията на NOS и съответно върху NO-медираната релаксация при електрическа стимулация.

По-нови данни от Lim et al. (2004) показват, че екзогенен CO може да повлияе нормални и туморно експресирани L-тип Ca-канални по пътя на активиране на NOS, повишаване нивата на NO и cGMP, но не и на PKG. Индуцираното от CO отделяне на NO може да обясни забележимото несъответствие между ниският афинитет на гуанилил циклазата за CO и силното отделяне на cGMP, повлияно от CO.

Експерименталните програми за отчитане на релаксиращо действие на hemin на фона на Pgf2 α -предизвикан тонус показват, че освобождаването на CO по време на действие на HO е ефективно премахнато /отстранено/ при претретирани с SnPPIX. Може да се предположи, че източника на CO който причинява релаксацията е невронална HO, тъй като hemin (респективно ендогенния CO) не успява да въздейства спонтанния тонус на изолираните препарати в присъствие на ТТХ, блокер на невроналното предаване. Резултатите, получени от прилагане на електрическа полева

стимулация също предполагат, че СО с невронален произход може да бъде съществен модулатор на съкратителната активност на фундус от стомах на морско свинче. Изглежда, че СО, продуциран в резултат на действието на НО в гладкомускулната тъкан, не е в състояние да въздейства на съкратителната активност в нетретирани морски свинчета. Данните от настоящите изследвания дават убедителни доказателства, че СО продуциран в невроналните елементи обслужващи гладките мускули на стомах упражнява съществена роля в модулиране на съкратителния отговор спрямо конвенционални невромедиатори. Може да се предположи, че СО се освобождава от синапсите и при различни честоти на стимулация. Основание за подобна преценка дава наблюдението, че hemin подобрява релаксаторния отговор на препаратите предизвикан от електрическа стимулация прилагана с честота 2 и 5 Hz.

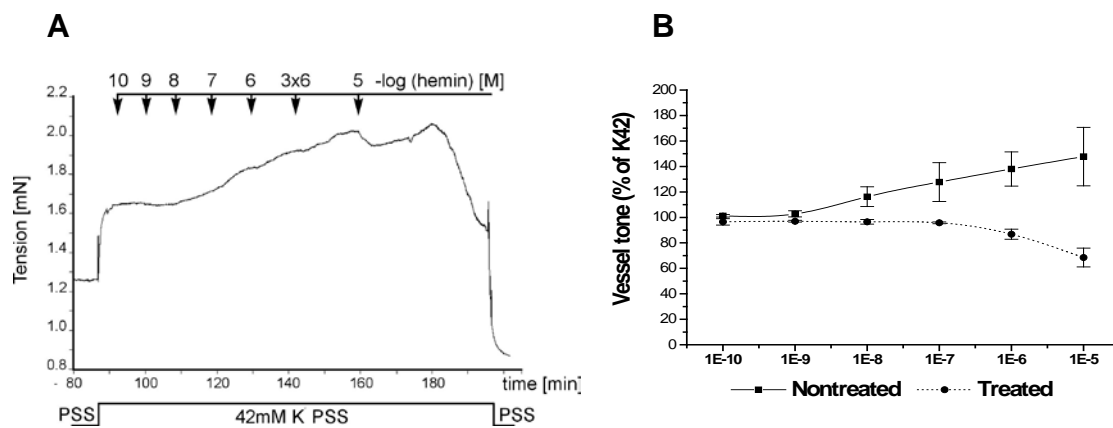
Следва да се отбележи факта, че се наблюдават различия в релаксаторните отговори предизвикани от електрическа стимулация при третирани и нетретирани животни. Налице е разлика в ефектите на калаен протопорфирин в зависимост от прилаганата концентрация и честотата на електрическата стимулация. SnPPIX в концентрация 1 $\mu\text{M/l}$ оказва по-отчетливо действие в антагонизиране на релаксиращия ефект на хемин при стимулация приложена с честота 5 Hz при третираните в сравнение с нетретираните морски свинчета. От тези резултати е възможно да се приеме, че в третираните животни, при прилагане на електрическа стимулация, НО се транспортира значително по ефективно по дължината на нервните терминали към ефекторните тъкани. В съгласие с предложеното становище са и резултатите, че сама по себе си електрическата стимулация подобрява дезинхибицията на невроналния НО от SnPPIX. В унисон на представените собствени наблюдения са данни на Chakder et al. (2000) показващи, че електрическа полева стимулация причинява увеличаване на активността на НО в нервните терминали на вътрешен анален сфинктер.

Обобщено, от изследванията проследяващи ролята на НО в съкратителната активност, както и от имунохистохимичните наблюдения може да се приеме, че външни въздействия (с тежки метали) и електрическа стимулация могат да съучастват в подобро транспортиране на НО-1 и НО-2 от мястото на синтезата им в посока на ефекторните клетки.

IV.2. Участие на ендогенния въглероден оксид в реализиране на съкратителния отговор при съдови гладко-мускулни препарати

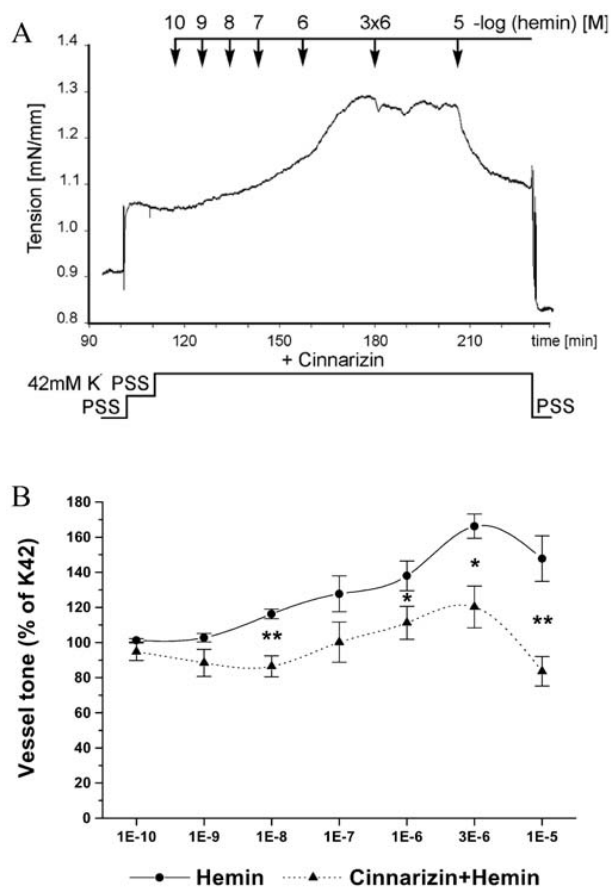
IV.2.1. Влияние на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на съдови препарати от *a. coronaris* на морско свинче – резултати и дискусия.

Функционалните експерименти върху тонуса на коронарната артерия, измерен в изометричен режим върху деендотелизирани артерии, показаха двуфазно зависим от концентрацията отговор на въздействие с hemin (Фиг. 10). Ниски концентрации на hemin предизвикаха невронално-зависима контракция, докато по-високи концентрации причиняват невронална и ендотелно-независима релаксация на коронарните препарати.



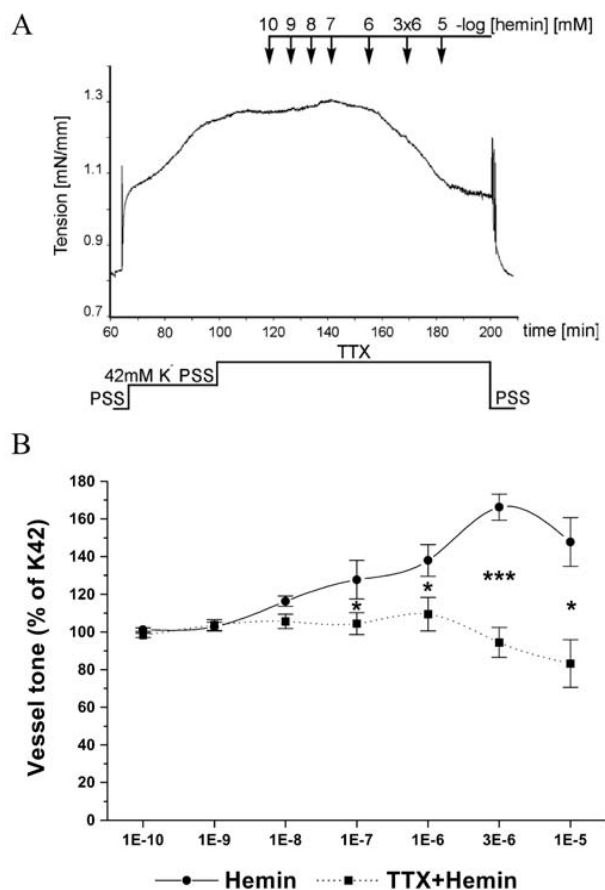
Фиг. 10. Ефект на hemin в нарастващи концентрации (1×10^{-10} - 5×10^{-5} M) върху повишения с 42mM K^+ тонус на сегмент от коронарна артерия на морско свинче. **A** – оригинален запис; **B** – Статистически данни за съкратителни отговор при третирани и нетретирани експериментални животни. Данните представят средно аритметично \pm SEM.

При наличие на екстрацелуларни антиоксиданти (SOD, каталаза, Vit C и Vit E), hemin доза-зависимо увеличава високия K^+ -индуциран тонус на коронарните артерии в концентрационния диапазон между 1 nM и 1 μ M. По-високи концентрации (10 μ M) индуцират релаксация на препаратите. Cinnarizin, известен като блокер на съдови L- и T-тип voltage-чувствителни Ca^{2+} канали (Petkov GV, 2001), води до намаляване на съдовия тонус в присъствието на hemin, като разликата е статистически значима при 10 μ M hemin (Фиг. 11). Фазата на увеличението на тонуса беше намалена след блокиране на voltage-зависимия Ca^{2+} входящ ток (Фиг. 11) и напълно премахната с ТТХ (Фиг. 12), а релаксаторната фаза изглежда е независима от voltage- чувствителния Ca^{2+} входящ ток.



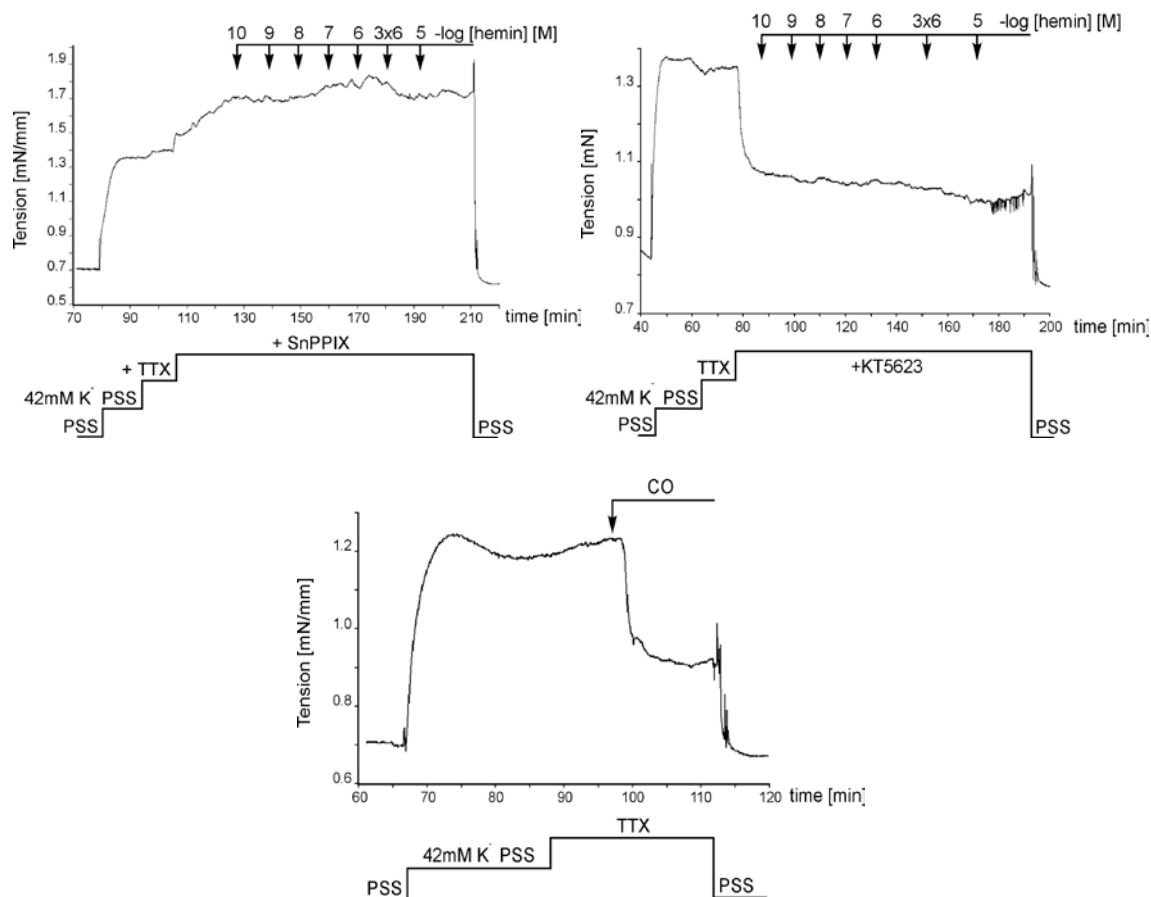
Фиг. 11. Ефект на hemin в нарастващи концентрации (1×10^{-10} - 5×10^{-5} M) в присъствието на cinnarizin (1×10^{-10}) върху повишения с 42mM K^+ тонус на сегмент от коронарна артерия на морско свинче. А– оригинален запис; В - статистически данни за съкратителни отговор при третиран и нетретиран експериментални животни. Данните представят средно аритметично \pm SEM.

В присъствието на ТТХ, повишаването концентрацията на hemin доведе до релаксация, която е значително по-различна от тази, причинени от hemin приложен самостоятелно в концентрации от 3-10 μM . Не се наблюдава увеличаване на тонуса в присъствието на ТТХ (Фиг. 12).



Фиг. 12. Ефект на hemin в нарастващи концентрации (1×10^{-10} - 5×10^{-5} M) в присъствието на TTX (1×10^{-10} M) върху повишения с 42mM K⁺ тонус на сегмент от коронарна артерия на морско свинче. **A**– оригинален запис; **B** - статистически данни за съкратителни отговор при третирани и нетретирани експериментални животни. Данните са средни \pm SEM.

При липса на антиоксиданти ефектът на hemin не се промени значително, което предполага, че неговото въздействие не може да се дължи на про-оксидантно действие на Fe²⁺ освободено по време на реакцията на HO. Biliverdin, прилаган на препарати в концентрации между 10 nm и 1 mM, също не повлия, предизвикания от висок K⁺ тонус на съдовете. Релаксаторният и контрактилният ефекти на hemin ефективно бяха неутрализирани както от SnPPIX (30 M), приложен в разтвора 20 минути преди hemin (**Фиг. 13A**), така и от селективния антагонист на cGMP-зависимата протеин киназа, KT5823 в микромолярни концентрации (**Фиг. 13B**).



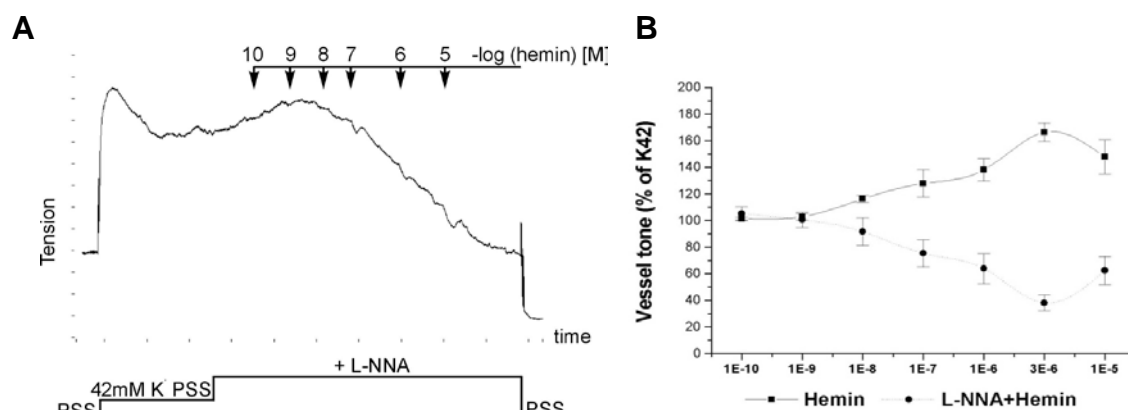
Фиг. 13. Оригинални записи, показващи концентрация-зависим ефект на hemin на преконтрахиранни с високо- K^+ коронарните артерии от морско свинче в присъствието на Sn-протопорфирин IX (SnPPIX, 30 μ M) (A) или населективен блокер на протеин киназа KT5623 (1 μ M) (B). Релаксаторният ефект на езогенен CO върху висок K^+ -евокиран тонус при коронарна артерия е показан в (C). CO беше приложен чрез аериране на работния разтвор. Във всички експерименти 1 μ M TTX е добавян преди другите субстанции, за да се предотврати освобождаването на невротрансмитери.

Присъствието на cinnarizine в TTX-съдържащите разтвори също така не повлия нито тонуса, нито амплитудата на hemin-предизвиканата релаксация.

Проведените експерименти с конкурентния инхибитор на NO - Sn-protoporphyrin IX (SnPPIX) показаха, че съкратителното действие на hemin в концентрация 1nM - 1 μ M върху 42 mM K^+ PSS преконтрахиранни сегменти е следствие от освобождаването на CO по време на NO-реакция, тъй като тя е ефективно премахната при претретиране с SnPPIX. В концентрация 10 μ M hemin предизвиква значителна релаксация на съда, която също бе блокирана от SnPPIX. Съкратителното действие на hemin е установено, че е tetrodotoxin (TTX)-чувствително, а релаксаторното действие - TTX-независимо.

В присъствието на L- ω -nitro-L-arginine (L-NNA, антагонист на NO-синтазата) артериалният отговор на hemin е релаксация, най-добре изразена в диапазона 10 nM -

1 μ M на използваните концентрации (Фиг. 14). Възможното взаимодействие между продуктите от HO и NO-синтаза се обсъжда на невронално и гладкомускулно на ниво.



Фиг. 14. Ефект на hemin в нарастващи концентрации (1×10^{-10} - 5×10^{-5} M) в присъствието на L-NNA (1×10^{-6} M) върху повишения с 42mM K⁺ тонус на сегмент от коронарна артерия на морско свинче. А – оригинален запис; В - статистически данни за съкратителни отговор при третиранни и нетретиранни експериментални животни. Данните представят средно аритметично \pm SEM.

CO, приложен директно чрез аериране на хранителния разтвор, предизвика само релаксация на съдовите сегменти, което надхвърля 50% от K⁺-индуцирания тонус. Следователно, това подсказва, че hemin-евокираните промени в тонуса на сегментите от коронарна артерия при нашите експериментални условия, са причинени от CO, освободен по време на HO-катализирана реакция чрез GC/cGMP-зависим път.

Има основание да се приеме, че наблюдаваното повишение на тонуса в присъствието на hemin е най-вече зависимо от някои невронални агенти, докато релаксацията е с гладко-мускулен произход. Като се има предвид, че по абсолютна стойност контролният тонус, предизвикан от разтвора с висок K⁺ не се промени значително от наличието на cinnarizin, изглежда, че разликите в ефекта на hemin между контролните и третиранни с cinnarizin препарати са също в резултат от някои невронално-зависими ефекти на този Ca²⁺ блокер. Последното предположение е допълнително подкрепено от наблюдението, че присъствието на cinnarizin в TTX-съдържащите разтвори не повлия нито тонуса, нито амплитудата на hemin-предизвиканата релаксация. По този начин може да се предположи, че CO получен от гладката мускулатура действа както на невронните елементи, така и на гладката мускулна тъкан на коронарните артерии. Ето защо, ако невроналното отделяне на невротрансмитери е блокирано с TTX, ефектът от CO върху гладката мускулатура е релаксация. Получените резултати подреят предположението, че експресията на

конститутивната HO-2 в коронарните артерии гладкомускулни клетки играе роля в моделиране тонуса на коронарна артерия.

Проследяването на тонуса на коронарна артерия показва двуфазен, концентрация-зависим отговор при въздействие с hemin. Фазата на повишаване на тонуса се потиска след блокиране на волтаж-зависимото навлизане на калций и напълно се премахва при въздействие с ТТХ. Фазата на релаксация е независима от потока на Ca²⁺. Това са убедителни доказателства, че увеличаването на тонуса може да се определи като зависимо от невронално отделена субстанция, докато релаксацията е с гладкомускулен произход. В този аспект, може да се предположи, че разликата в ефектите на хемин при контролни и cinnarisin-претретирани препарати е също резултат от невронално-зависим ефект на използвания блокер на навлизане на калций.

Експериментите с SnPPiX, конкурентен инхибитор на HO показват, че съкратителното, концентрация-зависимо действие на hemin върху преконтрахиранни сегмент-препарати може да се отдаде на освобождаване на CO по време на хемоксигеназна реакция, тъй като е налице ефективно премахване при претретиране с калаен протопорфирин. Двуфазния ефект на hemin върху препарати от коронарна артерия, невронално-зависимо повишаване на тонуса и невронално-независима релаксация се доказват при третиране на препаратите с блокера на невроналното провеждане ТТХ. ТТХ повлиява контрактилното действие и не повлиява релаксаторното действие на hemin.

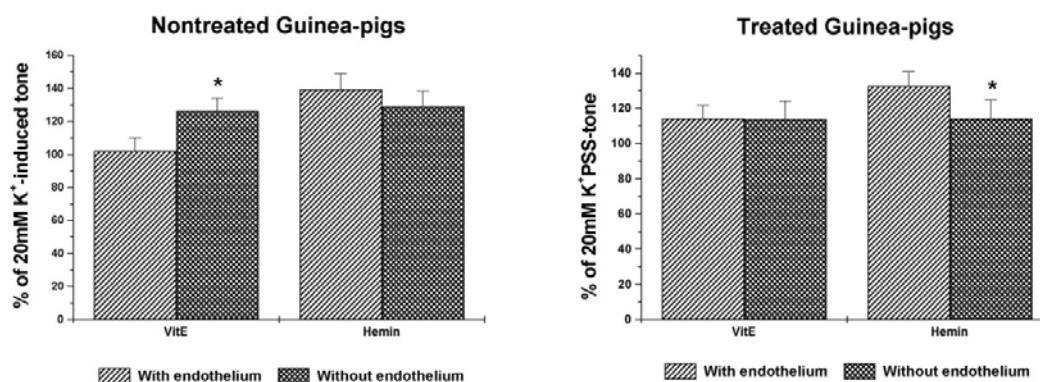
Наблюдението за предизвикан от hemin релаксаторен артериален отговор в присъствие на антагонист на NOS подсказва възможно взаимодействие между регулаторни механизми на HO и NOS на невронално и гладкомускулно ниво.

IV.2.2. Влияние на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на съдови препарати от *a. basilaris* на морско свинче – резултати и дискусия.

След периода на адаптиране, препаратите от базилярната артерия проявявиха спонтанна тонична активност. Преконтрахирането с 20mM калиев разтвор доведе до повишаване и стабилизиране на тонуса. Допълнително в разтвора еднократно беше добавян Vit E с цел неутрализиране на свободни радикали.

При контролните животни претретирането на препаратите с Vit E в концентрация 100µM доведе до намаляване на съдовия тонус. Отстраняването на ендотела повиши достоверно съдовия тонус.

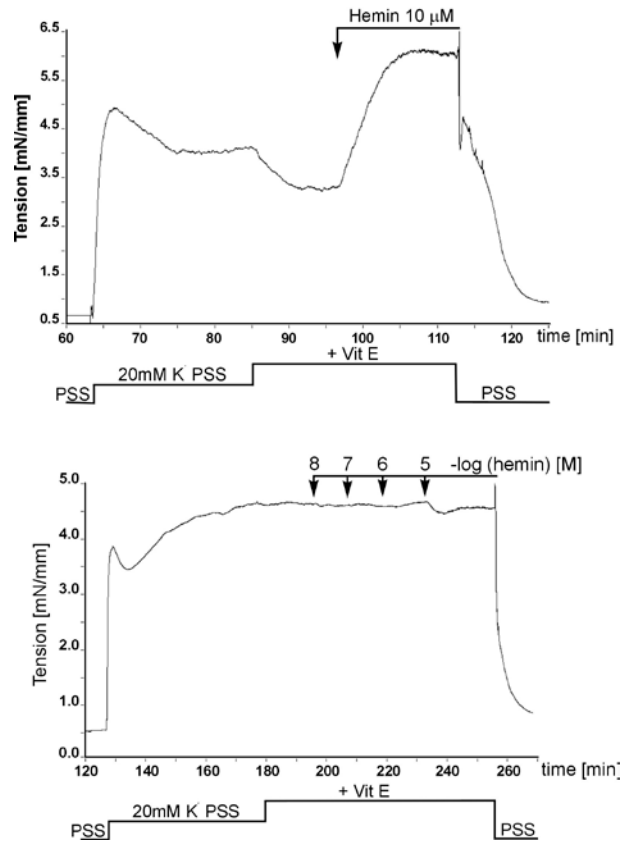
Субстратът на NO – hemin, приложен на фона на претретиране с Vit E предизвика съкратителен отговор както при интактните препарати, така и при тези с отстранен ендотел. В ниските приложени концентрации hemin няма съществен ефект върху изследваните препарати (Фиг. 15). В концентрациите от 100 nM – 10 μM hemin предизвиква понижаване на тонуса, най-добре изразено в най-високата приложена концентрация.



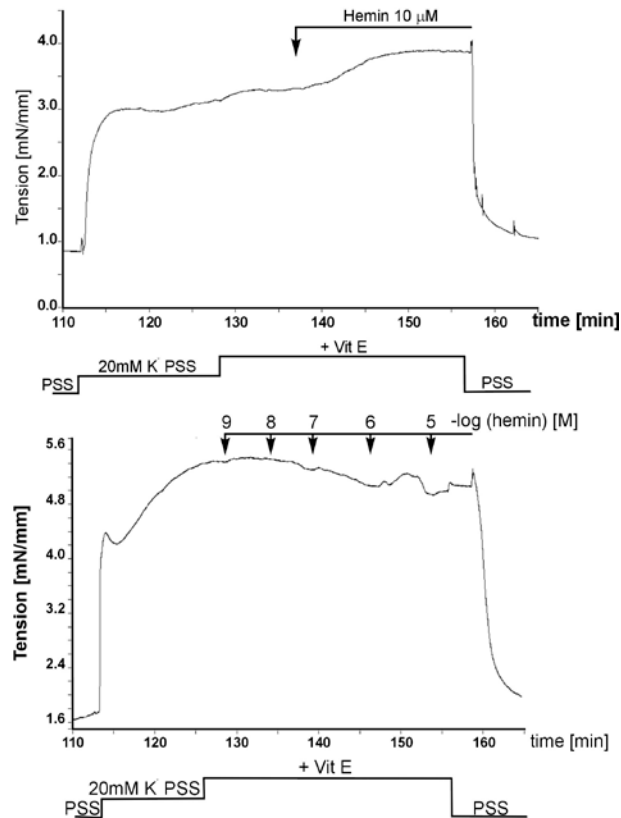
Фиг. 15. Влияние на CoCl_2 върху съкратителната активност на базиларна артерия от морско свинче. Данните представят средно аритметично \pm SEM (* $p < 0.05$, $n=4$)

Отстраняването на ендотела не предизвика съществена промяна в съкратителния отговор, но доведе до намаляване на тонуса с 10% в сравнение с тонуса при интактните препарати (Фиг. 15).

При животните третирани с CoCl_2 отстраняването на ендотела не предизвика промяна в базалния тонус при претретиране с VitE.



Фиг. 16. Оригинални записи, показващи ефект на ендогенния CO при контролни животни – оригинални записи. **A** – еднократно въздействие с hemin (10 μM); **B** – приложение на hemin в нарастващи концентрации (1×10^{-8} - 1×10^{-5} M). Експериментите са проведени в присъствие на Vit E (100 μM).



Фиг. 17. Оригинални записи, показващи ефект на ендогенния CO при третиране с CoCl_2 животни – оригинални записи. **A** – еднократно въздействие с hemin ($10 \mu\text{M}$); **B** – приложение на hemin в нарастващи концентрации (1×10^{-8} - $1 \times 10^{-5} \text{M}$). Експериментите са проведени в присъствие на Vit E ($100 \mu\text{M}$).

Hemin, приложен на фона на претретиране с Vit E, предизвиква повишаване на тонуса (**Фиг. 17**). Отстраняването на ендотела доведе до намаляване на тонуса с 18% в сравнение с този при съдовете с интактен ендотел.

За разлика от еднократното въздействие с hemin, кумулативното натоварване на съдовете както на контролните, така и на третираните с CoCl_2 животни в концентрации от 1nM - $10 \mu\text{M}$ оказва противоположен ефект (**Фиг. 17**).

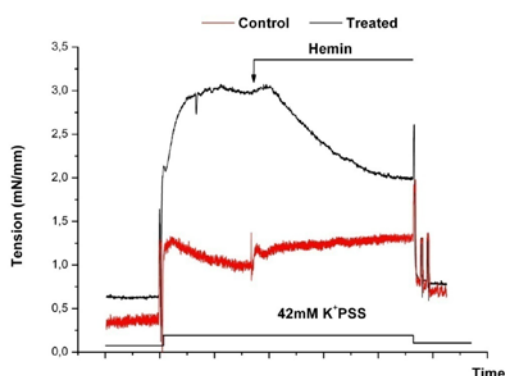
При съдовете на животните с предизвикан оксидативен стрес и интактен ендотел няма промяна в тонуса. Единствено при най-високата приложена концентрация $10 \mu\text{M}$ hemin предизвиква незначително намаляване на тонуса.

Резултатите, получени от експериментите за изследване влиянието на ендогенния CO върху *a. basilaris*, показват противоположен ефект на ендогенния въглероден оксид в сравнение с досега известните в литературата. Възможно обяснение е показаното от някои автори (Thorup et al., 1999), където основна роля за CO в бъбречните съдове е да се осигури защита срещу прекомерната вазоконстрикция, когато бъбречната система

NO е дефицитна. Обратно, свръхекспресия на съдово-специфичната NO-1 в гладката мускулатура, което води до 3-кратно повишаване на съдовата NO активност, намалява производството cGMP в отговор на NO, намалява NO-медирана вазодилатация, и причинява хипертония (Imai et al., 2001). В базална артерия е налице влияние на съдовия ендотел, особено при наличие на оксидативен стрес, като вероятно под въздействието на ендогенния въглероден оксид от него се отделят вещества, модулиращи съдовия тонус. Също така остава неизяснен въпроса за механизма на повлияване на съдовия тонус – дали е на невrogenно, миогенно ниво или е чрез модулиране освобождаването на трансмитери.

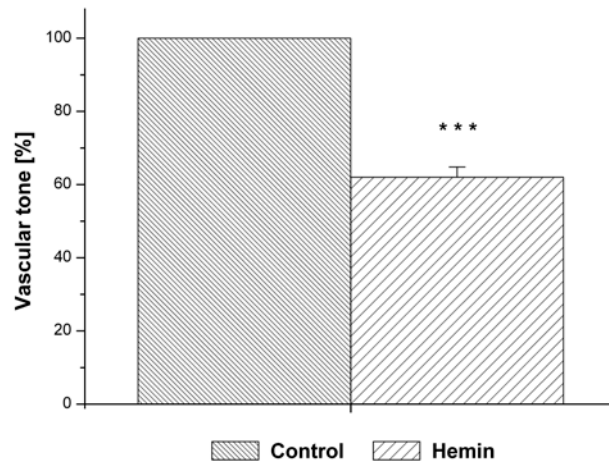
IV.2.3. Влияние на въглероден оксид върху съкратителната активност на съдови препарати от *a. ophthalmica* на плъх – резултати и обсъждане.

След периода на адаптиране, сегментите от *a. ophthalmica* проявявиха спонтанна тонична активност. Преконтрахирането с 42mM калиев разтвор доведе до повишаване и стабилизиране на тонуса.



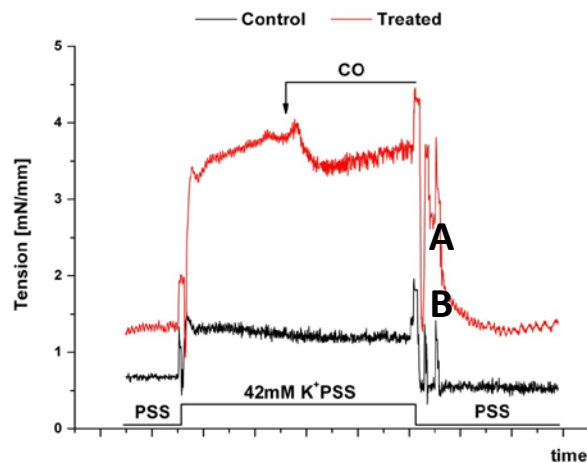
Фиг. 18. Оригинален запис, показващ ефект на ендогенния CO - еднократно въздействие с hemin (10 μ M).

Субстратът на NO – hemin, приложен в концентрация 10 μ M предизвика релаксаторен отговор на съдовата стена (**Фиг. 18**). Намаляването на съдовия тонус достигна до 62% от мускулния тонус при контролните съдови сегменти (**Фиг. 18**).



Фиг. 19. Влияние на ендогенен CO върху съдовият тонус на сегменти от *a. ophthalmica*: Control - нетретирани сегменти; Hemin – ефект на hemin (10 μ M) върху *a. ophthalmica*. Данните представят средно аритметично \pm SEM (***) $p < 0.001$, $n=5$).

Прилагането на екзогенен CO чрез аериране на работния разтвор със 100% въглероден оксид паралелно с аерацията с нормална газова смес, предизвиква намаляване на съдовия тонус (**Фиг. 20**) в сравнение с тонусът при контролните, нетретирани с екзогенен CO съдови сегменти.



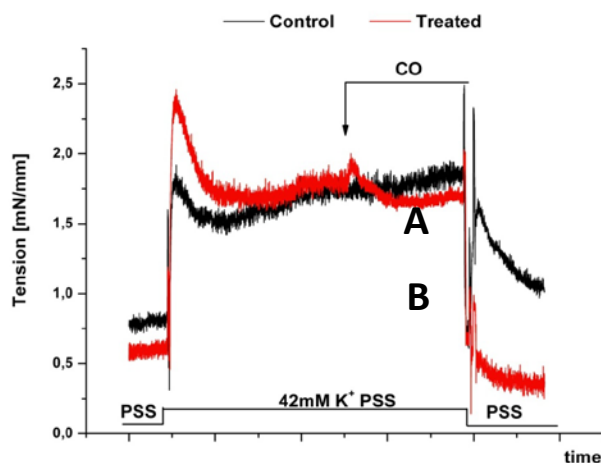
Фиг. 20. Оригинален запис, показващ ефект на екзогенния CO – паралелна аерация на работния разтвор с въглероден оксид (100%). A – сегменти третирани с екзогенен CO; B – контролни сегменти.

Резултатите, получени от експериментите за изследване влиянието на ендогенния CO върху *a. ophthalmica* показват, че понижаването на съдовия тонус се дължи на отделения при разграждането на hemin въглероден оксид. Това действие на ендогенния и екзогенен CO е в унисон с предложената от Leffler и колектив (2006) схема на действието на ендогенния CO в мозъчни кръвоносни съдове.

Данните от експериментите за проучване влиянието на ендогенния CO върху *a. ophthalmica* с които разполагаме, дават основание за провеждане на дългително изследване на точните механизми на въздействие и взаимодействие на ензимните системи при този модел на предизвикан оксидативен стрес.

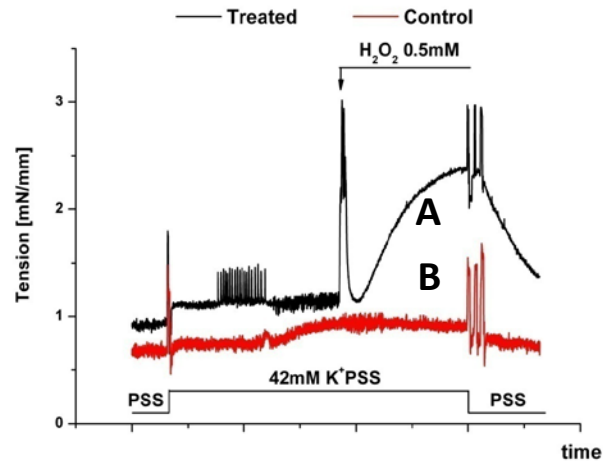
IV.3. Промени в съкратителната активност под влияние на свободни кислородни форми – резултати и обсъждане.

При този експериментален протокол съдови сегменти бяха инкубирани с 0.5 mM H₂O₂ за 30 мин. преди преконтрахирането с 42mM K⁺ PSS. След стабилизиране на съдовият тонус, работният разтвор се аерираше със 100% CO паралелно с нормалната аерация (Фиг. 21).



Фиг. 21. Оригинален запис, показващ ефект на екзогенния CO. **A** – контролен, нетретиран сегмент; **B** – ефект върху третиран с H₂O₂ сегмент от *a. ophthalmica*.

Екзогенният CO предизвика понижаване на съдовия тонус с до 10% в сравнение с тонуса при контролните съдови сегменти, аерирани единствено с нормална газова смес.



Фиг. 22. Оригинален запис, показващ ефект на H_2O_2 . **A** – ефект на H_2O_2 (0.5 mM) върху сегмент от *a. ophthalmica*; **B** – контролен, нетретиран сегмент.

Въздействието с 0.5 mM H_2O_2 , въведен еднократно в работния разтвор върху съдовият тонус на нетретиранни съдови сегменти, предизвика покачване на тонуса в сравнение с този при контролните съдови сегменти (**Фиг. 22**). Вероятно този ефект се дължи на негативното въздействие на H_2O_2 върху езимните системи NOS/NO и HO/CO и нарушаване на баланса в тяхното функциониране. Това води до намалено освобождаване на NO (CO), което успоредно с прякото въздействие на водородния пероксид води до повишаване на съдовия тонус.

V. Заключение

Основната таргетна молекула на CO е желязния център в хема на хем-протеини, включително и каталаза, циклооксигеназа, Цитохром-с, COX, цитохром P450, простагландин ендопероксидсинтаза, sGC, Hb, Mb, NADPH-оксидаза, азотно окисна синтаза (NOS), пероксидази, Простагландин H синтаза и триптофан диоксигеназа (Wu a. Wang, 2005). Високите концентрации CO причиняват хипоксемия чрез конкурентно свързване на кислород-свързващите места на Hb, като афинитетът на CO е около 200-250 пъти по-висок от този на кислорода (Prockop a. Chichkova, 2007; Wu a. Wang, 2005).

Ниски нива на CO могат да повлияят на няколко сигнални пътища, включително тези, регулирани от sGC и/или MAPK (Morita et al., 1995; Maines, 1997; Otterbeinet al., 2003; Ryter et al., 2004, Kim et al. 2006). sGC, физиологичният рецептор за NO, катализира превръщането на гуанозин-трифосфат (GTP) във вторичния посредник гуанозин-3,5-цикличен монофосфат (cGMP), което от своя страна играе ключова роля в редица физиологични процеси, включващи вазодилатация и невронална сигнална трансдукция (Hofmann, 2005; Moncada a. Higgs, 2006; Derbyshire a. Marletta, 2009; Friebed a. Koesling, 2009; Kleppisch a. Feil, 2009; Mergia et al., 2009; Domek-Lopacinska a. Strosznajder, 2010; Garthwaite, 2010). В допълнение към NO, sGC леко се активира от CO (Pal a. Kitagawa, 2010). За отбелязване е, че CO и екзогенни съединения като (YC-1) и (BAY 41-2272) синергично активират sGC до нива приблизително подобни на тези, предизвикани от NO (Pal a. Kitagawa, 2010; Martin et al., 2005). Тази индукция на sGC води до увеличаване на нивото cGMP и активирането на cGMP-зависимата протеин киназа (PKG), като по този начин се засягат няколко клетъчни функции на базата на действията на йонни канали, фосфодиестерази, и протеин кинази (Hofmann, 2005; Friebed a. Koesling, 2009; Lucas et al., 2000; Kaupp a. Seifert, 2002; Fiedler et al., 2006; Francis et al., 2005; Rybalkina et al., 2010; Cukkeman et al., 2011).

Както CO, така и последващото образуване на cGMP по веригата, са замесени в редица невронални сигнални процеси, включително обонятелна невротрансмисия (Kim et al., 2006). Освен това, чрез активиране sGC, CO е замесен в регулирането на тонуса на съдовете, в инхибирането на тромбоцитната агрегация, и в инхибирането на пролиферацията на гладкомускулните клетки (Pae et al., 2010). Предполага се, че CO може да бъде модулатор на нивата на cGMP чрез взаимодействие със сигналната система sGC/NO в мозъка. Също така се предполага, че невроналната (nNOS)/NO

система не е функционална в отсъствието на NO-2, като самият CO е достатъчен за възстановяване на физиологичните ефекти на NO (Wu a. Wang, 2005; Pae et al., 2010).

Взаимодействието на CO с йонни канали (по-специално с K^+ -канални) представлява важен механизъм в основата на биологичните ефекти на CO. Семейството на K^+ канали се състои от зависими от напрежението (K_V), АТР-чувствителни (K_{ATP}) и Ca^{2+} -активирани (K_{Ca}) канали. Високо-проводимите K_{Ca} канали (BK_{Ca}) и Ca^{2+} -активируемите транзитни K_{Ca} доказано се активират от CO (Wu a. Wang, 2005). Изследвана е също така и ролята на BK_{Ca} -каналите в регулацията на съдовия тонус, при определянето на продължителността на акционния потенциал и честотата, и в освобождаването на невротрансмитер (Salkoff et al., 2006). Изследвано е и че PKG-зависимо активиране на Na^+/Ca^{2+} -помпа от CO (Wu a. Wang, 2005) може да се повиши субмембранната Ca^{2+} концентрация в близост до BK_{Ca} каналите с тяхното последващо отваряне, което е потвърждение на получените от нашата работна група резултати при изследване на коронарна артерия на морско свинче (Gagov et al., 2003). Веднъж активиран, cGMP-пътя може да бъде податлив за активиране от CO чрез BK_{Ca} канали (Wu a. Wang, 2005). В допълнение на PKG-зависимия механизъм, е предположено, че самите директно стимулираните от CO BK_{Ca} канали са газови сензори (Hou et al., 2009). CO, действащ като газ или CO-освобождаващи молекули (CORMs) (Johnson et al., 2003), увеличава вероятността на отваряне на канал (White et al., 2000; Jaggar et al., 2002; Xi et al., 2004) дори при фрагменти от мембрани (Williams et al., 2004, Williams et al., 2008; Wu et al., 2002), което предполага възможността CO да модулира канал пряко или косвено чрез тясно свързани с канала протеини, вероятно в същия макромолекулен комплекс (Hou et al., 2009).

За отбелязване е, че CO също така инхибира активността на цитохром p450 и NADPH оксидазния цитохром b558, като тези хем-протеини могат да бъдат въввлечени в образуване на свободни радикали, оксидативен стрес, и индуцирана от оксидативен стрес апоптоза (Von Burg, 1999; Dulak a. Jozkowicz, 2003).

CO може да повиши образуването на ROS и про-възпалителни молекули, водещи до вредни ефекти в някои органи (например, в мозъка). В действителност е било показано, че CO увеличава образуването на про-възпалителни простагландини чрез активиране на COX в хипоталамусни експланти на плъхове и в първична култура на хипоталамусни астроцити на плъх, което предполага, че CO стимулира про-възпалителни отговори най-малко в мозъка. Освен това, CO е показано, че намалява клетъчните нива на антиоксиданти (например, глутатион) чрез повишаване на

митохондриалната ROS-формация чрез CO свързване към цитохром a3 мястото в комплекс IV, което показва, че CO може да предизвика окислително увреждане на тъканта (Kim et al., 2011).

Повишеното активиране на системата HO/CO може да има пагубни последици за нормалната хомеостаза, по-специално, HO-1 може да допринесе за тъканно увреждане при определени неблагоприятни обстоятелства. В частност, прекомерно активиране на HO и увеличението на крайните продукти (т.е. свободно желязо, BV и CO) могат да имат про-оксидантни, проапоптотични, про-възпалителни и про-пролиферативни ефекти. Прекомерното активиране на HO/CO системата при бозайници може да бъде свързано с няколко клинични условия, както и да изостри вирулентността и патогенни ефекти на някои микробни инфекции (Kinobe et al., 2008).

В някои тъкани и при определени условия, HO активност може да се счита за вредна в развитието и прогресирането на рак (Kinobe et al., 2008). В действителност, се спекулира, че цитозащитни ефекти на HO в раковите клетки могат да улеснят избягване на оксидативния стрес, насърчаване на резистентност към няколко терапии и увеличаване тумор оцеляване, растеж, инвазивност и метастази (Kinobe et al., 2008; Was et al., 2010). За отбелязване е, че регулация на HO-1 експресия е наблюдавана при някои тумори, включително аденокарцином, хронична миелоидна левкемия, хепатом, орално плоскоклетъчен карцином, лимфосарком, злокачествен меланом, олигодендроглиом, церебрален глиобластом и астроцитом рак на простатата, и бъбречно-клетъчен карцином (Kinobe et al., 2008; Was et al., 2010). Неблагоприятните въздействия поради активация на HO са строго свързани с освобождаването на свободни желязо (про-оксидант, който предизвиква оксидативен стрес и нараняване на тъканите), BV и CO (при увеличени клетъчните нива могат да насърчават или обострят патологични състояния, в зависимост от тъканта и обстоятелствата). Много заболявания, включително хемолитични, възпалителни, и окислителни състояния, са свързани с аномален CO метаболизъм и функции (Owens, 2010; Ghosh et al., 2010).

При някои свързани с възрастта невродегенеративни заболявания като болестта на Алцхаймер и Паркинсон е описана хронична свръхекспресия на HO-1, както и съпътстващо освобождаване на вътреклетъчно свободно желязо и CO, което може да допринесе за достигане на аномални нива на отлагане на желязо в мозъка и митохондриална недостатъчност (Kinobe et al., 2008).

Екзогенният CO е отровен за хората и нарушава абсорбционния капацитет на Hb за O₂ (Raub, 1999; Prockop a. Chichkova, 2007; Goldstein, 2008; Wu a. Wang, 2005).

Въпреки това, еукариотните организми използват ендегенен СО, произведена по време на разграждане хема от високо специализирани НО-ензими (Maines, 1988; McCoubrey et al., 1997; Liu a. Ortiz de Montellano, 2000; Wu a. Wang, 2005; Ryter et al., 2006; Piantadosi, 2008), като невротрансмитер и като физиологична сигнална молекула (Wu a. Wang, 2005; Bilban et al., 2008, Lakkisto et al., 2010). Като цяло, НО-зависимото ендегенно производство на СО в почти всички области на живота изглежда че подкрепя ключовата роля СО в много биологични процеси (Oelgeschlager a. Rother, 2008; Techtmann et al., 2009; Mörsdorf et al., 1992).

През последните години са направени пробиви в разбирането на системата НО/СО. Наскоро бе доказано, че ендегенният СО действа като цитозащитна и хомеостатична молекула с важна роля за сигнализиране във физиологични и патологични състояния. В действителност, при отчитане на антиапоптотични, противовъзпалителни, антиоксидантни, антипроли-феративни и съдоразширяващи ефекти на НО-1 и нейни крайни продукти *in vitro*, въглеродният оксид може да повлияе на няколко патофизиологични състояния (Wu a. Wang, 2005; Kim et al., 2006; Bilban et al., 2006; Ryter et al., 2006; Foresti et al., 2008). Към днешна дата, открито се обсъжда как експозицията на СО модулира молекулярната продукция на клетката, за да се индуцира хомеостатичен отговор след стрес-стимули (Bilban et al., 2008). Забележително е, че СО взаимодейства с няколко цели клетъчни хемопротеини, въпреки че функционалното значение на тези взаимодействия е все още ясно (Techtmann et al., 2009; Wu a. Wang, 2005; Ascenzi et al., 2007; Kajimura et al., 2010). Също така, СО, доставен като газ или чрез CORMs, показва терапевтичен потенциал при възпаление, сепсис, увреждане на белия дроб, сърдечно-съдови заболявания, трансплантация и рак, като това се поддържа от предклинични доказателства, в различни животински модели (Foresti et al., 2008; Motterlini et al., 2010). Технологията вече е насочена в привеждане на СО в клинични приложения под формата на инхалаторна газова терапия или чрез потенциалното използване на парентерално- и орално активни CORMs. Въпреки това, предстои значителна работа и все още е необходимо да се съпоставят тези външни ефекти, с тези, генерирани ендегенно (Foresti et al., 2008; Motterlini et al., 2010).

Накрая, взаимодействието между СО и други газове, като O_2 , NO, и H_2S , се проявява основно в няколко патофизиологични състояния, включително митохондриално дишане; вазодилатация, ангиогенеза и съдово ремоделиране; възпаление и оксидативен и нитрозативен стрес (Kajimura et al., 2010; Pun et al., 2010; Li et al., 2009). Въпреки това, молекулярните механизми на действие на СО е трудно да

се установят по-подробно. Всъщност, хем-протеините, играят ключова роля в производството на CO, осъществяваната от него сигнално предаване и взаимодействие, предоставят места за свързване, където газовите невротрансмитери може да взаимодействат помежду си и понижават концентрацията на определения свободен газ. По този начин концентрацията на свободния и свързан газ е трудно да се определи (Kajimura et al., 2010, Piantadosi, 2008; Pae et al., 2009; Li et al., 2009; Spillers, 2011).

VI. Изводи

1. Локализирането на NO-2 в миентеричните неврони, а на NO-1 главно в проекциите на миентеричните неврони инервиращи мускулната стена показва, че третирането с CoCl_2 и ЕПС ускорява транспортирането на ензима в еферентна посока.

2. Ендогенният CO отделен от гладкомускулните клетки, има незначителен ефект, проявяващ се само като намаление на релаксаторния отговор на гладката мускулатура при ЕПС в третираните животни.

3. Експресията на конститутивната NO-2 в гладкомускулните клетки на коронарните артерии участва в модулацията на съдовия тонус. Ефектът на субстрата на NO hemin в ниски концентрации показва, че се индуцира невронално-зависимо съкращение, докато при по-високи концентрации се причинява невронална и ендотел-независима релаксация на коронарна артерия.

4. Конститутивната NO-2 се експресира в съдовата стена на *a. ophthalmica*, индикация за което е намаляването на съдовия тонус при въздействие с hemin.

5. Оксидативен стрес причинен от свободни кислородни форми може да доведе до увеличаване на съдовия тонус, и намаляване на пропускливостта на съответните съдове. Системата NO/CO действа компенсаторно и спомага за възстановяване на кръвния ток.

VII. Приноси

- За първи път е изследвана връзката и е установено взаимодействието между ензимните системи NOS/NO и HO/CO във фундус от стомах на морско свинче.
- Оригинални данни са получени при изследване въздействието *in vitro* на свободни кислородни форми при малки кръвоносни съдове. Показано е нарушаване на баланса във функциите на ензимните системи NOS/NO и HO/CO.
- За първи път е разработена и въведена методика за изолиране на *a. ophthalmica* при изследването ѝ *in vitro*.

VIII. Публикации по темата на дисертацията

1. EFFECTS OF CORM-3 ON GUINEA PIG CORONARY ARTERY

Petkova-Kirova P.; Borisov R.; Dimitrova D.; **Kadinov, B.**; Gagov, H.

COMPTE RENDUS DE L ACADEMIE BULGARE DES SCIENCES Volume: **63** Issue: **3** Pages: **383-390**

Published: **2010** Times Cited: **0** (from Web of Science) **IF 0.152**

2. H₂O₂-induced contractility disturbances in guinea pig ileum

Mizhorkova, Z.; Sotirov, E.; **Kadinov, B.**, Milusheva E.

COMPTE RENDUS DE L ACADEMIE BULGARE DES SCIENCES Volume: **59** Issue: **10** Pages: **1053-1058**

Published: **2006** Times Cited: **0**

3. Role of constitutively expressed heme oxygenase-2 in the regulation of guinea pig coronary artery tone

Gagov H.; **Kadinov B.**; Hristov K.; Boev, K.; Itzev, D.; Bolton, T.; Duridanova, D.

PFLUGERS ARCHIV-EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY Volume: **446** Issue: **4** Pages: **412-421**

DOI: **10.1007/s00424-002-1003-x** Published: **JUL 2003**

Times Cited: **16** (from Web of Science)

4. Induction of heme oxygenase in guinea-pig stomach: roles in contraction and in single muscle cell ionic currents

Kadinov B.; Itzev D.; Gagov H.; Christova, T.; Bolton, T.B.; Duridanova, D.

ACTA PHYSIOLOGICA SCANDINAVICA Volume: **175** Issue: **4** Pages: **297-313**

DOI: **10.1046/j.1365-201X.2002.00995.x** Published: **AUG 2002**

Times Cited: **6** (from Web of Science)

IX. Участия в национални и международни научни форуми във връзка с дисертацията
2nd International Conference on Heme Oxygenase (HO/CO) and Cellular Stress Response, Catania, Italy, June 6-9, 2002

1. Interaction between the endogenous carbon monoxide (co) and nitric oxide (no) in guinea pig coronary artery

Boris Kadinov , Thomas Bolton and Dessislava Duridanova

VI National Congress of Pharmacology, 1-4 October 2009 – 3 posters:

2. Effect of carbon monoxide on contractile activity of A. ophthalmica –in vitro model

B. Kadinov , M. Penkova, Autonomic & Autacoid Pharmacology 2010, 30, 28

Xth National Congress of Bulgarian Society for Physiological Sciences, Varna, 6-9 October 2011

3. Influence between NO and CO on the electrical evoked response in guinea pig stomach fundus

Boris Kadinov, Dimiter Itzev, Radomir Radomirov, Dessislava Duridanova