

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН
“ДОКТОР”**

**НЕВРОМОДУЛАТОРНИ И ПРОТЕКТИВНИ ЕФЕКТИ НА
ВАЗОАКТИВНИЯ ИНТЕСТИНАЛЕН ПЕПТИД**

Мария Иванова Лазарова

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научна специалност: „Физиология на животните и човека“

Научен ръководител: Проф. д-р Рени Емил Калфин, ИНБ – БАН

София, 2018

Дисертационният труд съдържа 134 стандартни машинописни страници. За онагледяване са използвани 7 таблици и 21 фигури. Библиографската справка обхваща 393 източника.

Експерименталната работа, свързана с изложените в представения дисертационен труд резултати, е извършена основно в лабораториите на Института по невробиология - БАН. Част от изследванията са проведени в Института по микробиология - БАН.

Вътрешната защита на дисертационния труд е проведена на 25.04.2018 г. на разширено заседание на Научни направления „Синаптична сигнализация и комуникации“ и „Поведенческа невробиология“ в Институт по невробиология-БАН.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 14.09.2018 г. от 12.30 часа в Заседателната зала на Института по невробиология при БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 23, ет 2, на открито заседание на Научното жури.

Научно жури в състав:

1. Проф. д-р Анна Толева, дм, Медицински факултет на Тракийски университет - Стара Загора, външен член на Научното жури
2. Проф. дхн Иванка Стойнева, Институт по органична химия с център по фитохимия – БАН, външен член на Научното жури
3. Проф. дбн Атанас Кръстев, Медицински университет – Пловдив, външен член на Научното жури
4. Доц. д-р Боряна Русева, дм, Медицински университет – Плевен, външен член на Научното жури
5. Проф. д-р Рени Калфин, Институт по невробиология – БАН, вътрешен член на Научното жури

Резервни членове:

1. Доц. д-р Юлия Николова, дм, Медицински университет – Пловдив, външен резервен член на Научното жури
2. Доц. д-р Валентина Григорова, дм, Институт по невробиология, БАН – вътрешен резервен член на Научното жури

Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на Института по невробиология на БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 23, ет 2.

СЪДЪРЖАНИЕ	Стр.
Списък на най-често използваните съкращения	4
Въведение	5
Методи и материали	8
Резултати	26
Обсъждане	47
Изводи	53
Приноси	54
Публикации във връзка с дисертационния труд	55
Съобщения по темата на дисертационния труд	55
Участия в научни проекти по темата на дисертационния труд	57
Цитирания на статиите от дисертационния труд	57

Списък на най-често използваните съкращения

А. На латиница:

6-OHDA	6-Хидрокси допамин
ATP	Аденозинтрифосфат
ACh	Ацетилхолин (Acetylcholine)
CGRP	Калцитонинов ген-свързан протеин (Calcitonin gene-related peptide)
DA	Допамин
GABA	Гама аминокиселина (Gamma amino butyric acid)
GPCR	Г - протеин свързан рецептор
INF- γ	Интерферон гама
IUPHAR	Международен фармакологичен съюз (International Union of Basic and Clinical Pharmacology)
NA	Норадреналин
PACAP	Хипофизарен полипептид, активатор на аденилат циклазата (Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide)
TNF- α	Тумор некрозен фактор алфа
VIP	Вазоактивен интестинален пептид

Б. На кирилица:

АК	Аmino киселина(и)
АЛАТ	Аланин-аминотрансферазата
АСАТ	Аспартил-аминотрансферазата
БП	Болест на Паркинсон
ЗИ	Зимозан
ПЕС	Полева електрическа стимулация
СЧТ	Стомашно-чревен тракт
ЦНС	Централна нервна система

Въведение

От началото на 1970 г. непрекъснато расте броят на биологично активните пептиди, изолирани в структури на централна и периферна нервна система. През годините представата за тяхната роля в организма до голяма степен се промени. Установени бяха редица „несвойствени“ ефекти на отдавна известни неuropeптиди. Хипоталамусните „регулиращи“ пептидни хормони /либерини и статини/, например, са представени широко и в екстрахипоталамични зони на мозъка, където проявяват редица физиологични ефекти, които не са свързани със "собствената" им хормонална функция. Революция в науката предизвика и откритието, че в мозъка беше доказано наличието на пептиди, които от десетилетия се считаха за периферни хормони, като вазоактивен интестинален пептид (VIP) и холецистокинин (ССК) и обратно, пептиди, първоначално изолирани от мозъка, бяха идентифицирани и в периферните органи (соматостатин). В последствие те бяха обединени и класифицирани като “мозъчно-чревни” пептиди, идентифицирани както в мозъка, така и в стомашно - чревния тракт. Доказано бе, че много от биологично активните пептиди имат невромедиаторна и / или невромодулаторна роля, а част от тях са колокализирани заедно с други класически невротрансмитери в едни и същи неврони. Открити бяха нови ендогенни пептиди, чиито централни и периферни ефекти, както и механизмите им на действие все още не са напълно изяснени.

Разпределението на неuropeптите в организма, както физиологичните и фармакологичните им отнасяния са все още обект на интензивни проучвания.

VIP е една от молекулите, към която научните среди показват нестихващ интерес вече няколко десетилетия. Много детайли относно механизма на действие на този пептид, неговото разпространение и функции вече са установени. Известно е, че физиологичните си ефекти той реализира чрез три G-протеин свързани рецептора VPAC1, VPAC2 и PAC1, които преферентно активират аденилатциклазата и повишават нивото на вътреклетъчния cAMP. Използването на широк набор *in vitro* и *in vivo* експериментални методики, включително клетъчно-свързани функционални анализи, VPAC / PAC рецепторна активация, използването на трансгенни животни, както и на експериментални модели на различни заболявания, свързаха неuropeптида с протичането

на различни физиологични процеси (контрол на сърдечната честота, гладкомускулна релаксация, вазодилатация и др.) и клинични състояния (пулмонарна хипертензия, ахалазия, диабетната импотентност и др. Предполага се, че промените в нивата на неврпептида в нервната тъкан са ключов фактор при развитието на невродегенеративни заболявания като множествената склероза, болестта на Алцхаймер, болестта на Паркинсон (БП) и обратно самите неврологични заболявания предизвикват нарушения в баланса на VIP нивата. Връзка между VIP и невродегенеративните заболявания са и неговите невротрофични, невропротективни, имуномодулаторни и противовъзпалителни свойства, които го правят много подходящ терапевтичен агент за лечение на различни автоимунни, невродегенеративни и възпалителни заболявания. На дадения етап използването на VIP в клиничната практика е силно ограничено поради лимитираното му преминаване през кръвно-мозъчната бариера, неговото разграждане от плазмените протеини в системното кръвообращение и потенциалните странични ефекти в периферията. За да се избегнат тези неудобства се търсят нови агонисти, разработват се нови начини за прилагане на пептида. Работи се също така върху подобряване на защитата и доставката на пептида до точно определено място.

Въпреки огромното количество данни, натрупани за VIP през годините, изучаването на структурно-функционалната връзка между неврпептида и неговите рецептори при физиологични и патофизиологични условия продължава. Все още не са напълно изяснени невротрансмитерните / невромодулаторните взаимодействия между VIP и някои от класическите невротрансмитерни системи в периферия или в редица мозъчни структури, които преференциално се засягат при различни невродегенеративни заболявания.

Натрупването на нови данни, касаещи интимните механизми на действие на пептида само биха допринесли за приближаването на VIP към клиничната практика. Идващите години ще покажат дали ще съумеем да трансформираме обещаващия клиничен потенциал на VIP от експерименталните животински модели на различни заболявания в клиниката.

ЦЕЛ

Целта на настоящия труд бе да се изследват невромодулаторните и протективни ефекти на вазоактивния интестинален пептид в експериментални условия *in vitro* и *in vivo*

ЗАДАЧИ

За изпълнението на поставената цел бяха определени следните конкретни задачи на дисертационния труд:

I. В експерименти *in vitro*

1. Да се изследват ефектите на VIP върху електрически-предизвикани съкратителни отговори на гладкомускулни препарати от вас деференс на морско свинче и плъх.
2. Сравняване модулиращия ефект на VIP върху първата и втората компонента на електрически-предизвикани съкратителни отговори на гладкомускулни препарати от вас деференс на морско свинче и плъх.
3. Да се изследват ефектите на VIP върху АТР- и NA- предизвиканите съкратителни отговори на гладкомускулни препарати от вас деференс на морско свинче.

II. В експерименти *in vivo*

4. Проучване ефекта на локално въведен VIP върху екстрацелуларните нива на АСh и катехоламините А, NA и DA в мозъчна кора и хипокамп на свободно движещи се плъхове.

5. Проучване антиоксидантния ефект на VIP при експериментален модел на Паркинсонова болест чрез определяне клетъчните нива на липидна пероксидация и активността на ензима глутатион редуктаза като маркери за оксидативен стрес.
6. Изследване ефекта на VIP върху експериментален модел на остро възпаление посредством изучаване на:
 - Ефекта на невропептида върху преживяемостта на опитните животни.
 - Ефекта на VIP върху ранната продукция на цитокини/ хемокини .
 - Анализиране на структурните и функционални промени в черен дроб и бъбреци след прилагане на VIP.

III. Методи и материали

Проведените при разработването на дисертационния труд опити най-общо могат да бъдат разделени на две групи - експерименти *in vitro* върху изолирани гладко-мускулни органи и опити *in vivo* – върху интактни животни и такива с експериментален модел на Паркинсонова болест и модел на остро възпаление.

3.1. Експериментални животни

В проведените експерименти са използвани 40 броя мъжки, полово зрели морски свинчета от породата Charles River (300-500 гр.), 150 броя мъжки, полово зрели плъхове от породата Wistar (130-180 гр.и 200-300 гр.) и 30 броя женски мишки Balb / c (20-25 гр., Ifa-Credo, L'Abrese, France; Charles River Company). С оглед на адаптирането им, животните се отглеждат от пет до седем дни преди опитите във вивариум при температура 22-25 °C, с регулиран цикъл на осветление 12 часа светло / 12 часа тъмно и свободен достъп до храна и вода.

Всички експерименти са проведени съгласно “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” и правилата за

работа с лабораторни животни на Етичната Комисия на Институт по Невробиология – БАН.

3.2. Методи за изследване in vitro

3.2.1. Експериментална постановка за изследване на изолирани органи

Това е метод за регистрация на съкратителна активност на гладко-мускулни препарати, където контрактилният отговор може да бъде резултат от електрическа стимулация, имитираща възбуден процес в периферията, или от екзогенното въвеждане на различни субстанции. Промяната в амплитудата на съкратителния отговор служи за оценка на изследваните молекули.

Изолираните органи са относително опростена система, при която в значителна степен се елиминира влиянието на регулаторните механизми от страна на организма върху взаимодействието медиатор-рецептор, което позволява да се изследва непосредственото взаимодействие на молекулите на екзогенно приложено съединение с рецептори в ефекторния орган. Смята се, че това е модел, който може да даде информация за връзката структура-ефект, както и за определяне селективността на изследваната молекула към различните рецептори (Erspamer and Severini, 1992).

В нашите експерименти сме ползвали сегменти от простатна част на вас деференс от морско свинче и плъх.

3.2.1.2. Изолиране на гладкомускулни препарати от вас деференс на морско свинче и плъх

Коремната кухина се отваря по *linea alba*. Двата семепровода (вас деференс) се отделят и внимателно се почистват от съдържимото, съединителната тъкан и кръвоносните съдове. За целта на нашите експерименти се отделя сегмент от простатичната част на вас деференс с дължина 10 - 12 mm. Препаратите се монтират в органи вани (обем 4 ml или 10 ml) по дължина на лонгитудиналните гладкомускулни слоеве и се оставят за 60 минути да се адаптират. По време на адаптацияния период и до края на експеримента препаратите в органните вани с обем 4 ml се перфузират непрекъснато с аериран разтвор на Тироде (37 °C, pH 7,4; 95 % O₂ и 5 % CO₂), като за

целта се използва помпа тип Watson Marlow 205S при скорост на потока 1.8 ml / min. Във ваничките с обем 10 ml, разтвора се сменя с нов, предварително затоплен до 37 °C разтвор на всеки 15 минути. За постигане на максимално близък до нормалното физиологично състояние тонус на гладките мускули, препаратите се обтягат с напрежение еквивалентно на тежест от 1 гр за вас деференс на плъх и морско свинче. Това ставаше 10 минути преди изтичането на адаптационното време. Всеки гладкомускулен препарат се свързва изометрично с механоелектричен преобразовател (Swema SG 4 - 90). Регистрацията на съкратителната активност се извършва на директно пишещо, правотоково устройство (Linseis, Germany).

3.2.1.3. Метод на полева електрическа стимулация

Методът полева електрическа стимулация на гладкомускулни препарати е удобен модел, имитиращ възбуден процес в периферията (Burn and Rand, 1960). При него в резултат на действието на импулсното поле се постига деполяризация на невроните и отделяне на медиатор, което се проявява с бърз съкратителен отговор на изолирания гладкомускулен препарат. Импулсното поле се създава между два платинови електрода, поставени в органите ванички на разстояние 10 mm един от друг. Електрическата стимулация се осъществява със стимулатор тип GRASS S - 48, U.S.A. и се регистрира на директно пишещо, устройство (Linseis, Germany). Използват се правоъгълни импулси с продължителност 0.3-0.5 ms, честота 8 Hz, 80 пулса, супрамаксимален волтаж 40 V и интервал между сериите 3 мин. При тези параметри на ПЕС, органът отговаря с бифазен съкратителен отговор, състоящ се от начална бърза компонента последвана от втора по-бавна такава (Feden et al., 1981; Snnedon and Westfall, 1984)

3.2.1.4. Експериментален протокол

Ефектът на VIP върху съкратителната активност на вас деференс е изследван в две групи експерименти:

I. Ефект на VIP върху електрически-предизвиканите гладкомускулни съкращения на вас деференс от морско свинче и плъх

След получаването на 3-4 еднакви контролни съкратителни отговора при ПЕС, VIP (от 1 до 100 nM) е добавян в нарастваща концентрация (с измиване) 6 минути преди следващата електрическа стимулация

II. *Ефект на VIP върху АТР- и NA- предизвиканите гладкомускулни съкращения на вас деференс от морско свинче*

След получаването на три равни контролни отговора към АТР (100 μM) и NA (10 μM) (добавяни през 15 мин), VIP (10 nM) е добавян 6 минути преди последващото прилагане на агонистите.

Гванетидинът (1 μM, 30 мин) е прилаган за да блокира адренергичните неврони (Johnson and O' Brien, 1976) а ТТХ (1 μM, 15 мин) е прилаган за да блокира невроналното провеждане до гладкомускулните клетки (Gershon, 1967)

Всички изходни субстанции се разтварят непосредствено преди тяхната употреба.

С всяко от изследваните съединения са провеждани 5-7 опита на отделни гладкомускулни препарати от вас деференс на морско свинче и плъх.

3.3. Методи за изследване in vivo

Предимствата на експериментите *in vivo* са свързани с обстоятелството, че в изследваните организми са съхранени всички нервно-хуморални регулаторни механизми.

3.3.1 Стереотаксична техника

3.3.1.1. Имплантиране на микродиализни мембрани в мозъчни структури на плъх

Плъховете се анестезират с chloral hydrate (400 mg / kg живо тегло i.p) и се фиксират на стереотаксичен апарат. Премахват се меките тъкани на главата и периоста, отделят се темпоралните мускули след което в лявата и дясната темпорална кост се пробиват симетрични отвори с диаметър 1 mm. Микродиализните мембрани, нанизани върху водеща канюла от неръждаема стомана, се имплантират трансверзално с координати: AP = - 3.3 mm каудално и Н = +3.3 mm за хипокамп; AP = - 1 mm и Н = + 2,00 mm за кортекс (Paxinos and Watson, 1986) спрямо брегмата, съгласно процедурата,

описана от Wu и сътрудници, 1988. В двата края на имплантираната мембрана се поставят метални канюли с дължина 1 cm и диаметър 22 gauge и се закрепят за повърхността на черепа с помощта на зъботехнически дуракрил. Входното отворище на така фиксираната мембрана се свързва с микродиализна помпа (WPI, SP 200I Infusion Pump, USA) и през нея се пропуска физиологичен разтвор Целта на тази процедура е проверка проходимостта на мембраната. При провеждането на всички хирургически манипулации плъхчетата се намират под дълбока анестезия.

След излизане от упойка животните се поставят в самостоятелни плексигласови клетки със свободен достъп до храна и вода.

3.3.1.2. Верификация

Непосредствено след приключването на експериментите се извършва верификация на стереотаксичните попадения. За целта мозъците се фиксират в 9 % разтвор на формалин за 48-72 часа, след което се изготвят тънки мозъчни срези. В случаите, в които мембраната е извън изследваната структурата, резултатите от съответното животно не се вземаха предвид.

3.3.2. Микродиализна техника

3.3.2.1. Общи принципи на микродиализната техника

▲ Микродиализната техника позволява имплантиране на туболарна диализна мембрана в определена тъкан или орган.

▲ Имплантираната диализна мембрана имитира функциите на малък кръвоносен съд.

▲ Туболарната мембрана се перфузира постоянно с подходящ разтвор (физиологичен, Рингеров и др.), което позволява обмен на молекули с екастрацелуларната течност (ЕЦТ). Смята се, че химичният състав на перфузата в пробите отговаря на химичния състав на ЕЦТ за даден момент по отношение на дадена субстанция.

▲ Микродиализната техника позволява продължително събиране (часове и дни) на проби от осмотично дифузни компоненти на ЕЦТ без това да променя нейния обем.

▲ Скоростта на диализата през мембраната е такава, че позволява събирането на къси, концентрирани проби, които лесно могат да бъдат определени с HPLC.

▲ Микродиализната техника позволява локално въвеждане на екзогенни субстанции в изследваните структури.

3.3.2.2. Микродиализни тубуларни мембрани

Използват се микродиализни мембрани AN 69 (Dasco, Bologna, Италия) с вътрешен диаметър 220 μm и външен диаметър 310 μm , с пропускливост за молекули с молекулно тегло под 15 000 Da.

Диализата се извършва през област от мембраната с дължина 8 mm (съответстваща на дължината на кортекса) или 6 mm (за хипокампа). Останалата част от мембраната е покрита с лепило (Super - Epoxy), което възпрепятства протичането на диализата.

3.3.2.3. Въвеждане на веществата

Работните субстанции, разтворени „*ex tempore*” в Рингеров разтвор, се въвеждат локално през микродиализната мембрана, имплантирана в съответната мозъчна структура. Прилагането на изследваните вещества става за период от 40, 80 или 120 минути в зависимост от експеримента, след което перфузията продължава с Рингеров разтвор до края на опита.

3.3.2.4. Перфузия и събиране на пробите

Перфузията и събирането на проби започва 24 часа след хирургическата интервенция. Входното отворствие на имплантираната мембрана се свързва с микроперфузионна помпа (WPI, SP 200I Infusion Pump, USA), а изходното отворствие с епруветка за събиране на перфузата, съдържаща 5 μl HCl (0.5 mM). Мембраната се перфузира с Рингеров разтвор, съдържащ физостигмин сулфат (7 μM); който предотвратява хидролизата на ACh и скорост на потока 2 $\mu\text{l} / \text{min}$. В зависимост от експеримента проби се събират на всеки 20 или 40 минутни. Изключение прави т.нар. нулева фракция, която е с продължителност един час и обхваща стабилизационния период през който животното свиква с обстановката и манипулациите на опита. Обикновено следващите три диализни проби служат като контрола за определяне базалното ниво на изследвания извънклетъчен невротрансмитер в пробите. Експериментите са с продължителност 6-8 часа.

3.3.4.5. Количествено определяне на ACh в диализните проби

Количественото определяне на ACh в пробите става чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) с електрохимичен детектор (Damsma et al., 1987) и използването на външен стандарт.

Течният хроматограф се състои от помпа модел Waters 510 (Millipore corporation, Milford, USA), инжектор Rheodyne, катионно-обменна, аналитична колона (Chromosphere 5 C18, Chrompack) електрохимичен детектор Waters 460 (Millipore corporation, Milford, USA) и записващо устройство Waters 740 (Millipore corporation, Milford, USA)

При тази методика определянето на ACh е косвено. Диализните проби се пропускат през катионно-обменна аналитична колона (Chromosphere 5 C18, Chrompack) натоварена с натриев лаурилсулфат, където става разделяне на ACh и холина, след което пробите постъпват в ензимен реактор. Там с помощта на имобилизираните ензими ацетилхолинестераза (EC 3.1.1.7) и холиноксидаза (EC 1.1.3.17), диализатът се хидролизира до холин и ацетат, а холинът от своя страна се окислява до бетаин и водороден перексид. Водородният перексид се определя от електрохимичния детектор, снабден с платинов електрод, като е индиректен показател за съдържанието на ACh в пробите. Подвижната фаза представлява 0.2 М фосфатен буфер (pH = 8.0) към който бяха добавяни KCl (5 mM), тетраетиламоний (TMA, 1.0 mM) и EDTA (0.3 mM). Така получената фаза се филтрира през мембрани с големина на порите 0.45 μm (Supelco Inc., Bellefonte, P.A., U.S.A.) и сонифицира с ултразвук (Sonorex RK 100, Bandelin Electronic, Germany). Скоростта на потока е 0.7 ml / min, а инжектирания обем е 20 μl .

Височината на пика от изследваната проба се сравнявана с тази на стандартни проби ACh. Чрез построяване на стандартни криви и метода на линейна регресия се изчислява количеството ACh в изследваните проби. Всяка калибрационна крива се построява на основата на три или четири стандартни разреждания на ACh в Рингеров разтвор, инжектирани в началото и в края на експеримента. Количеството освободен ендогенен ACh от мозъчни структури на свободно движещи се плъхчета бе определяно в pmol, като чувствителността на метода възлизаше на 500 fmol.

3.3.2.6. Количествено определяне на катехоламини (E, NE, DA) в диализните проби

Количественото определяне на E, NE, DA става чрез HPLC с флуорисцентен детектор (Lozanov et al., 2004) и използване на вътрешен стандарт.

Течният хроматограф се състои от помпа модел P 2000 (Thermo Electron Spectra SYSEM), инжектор (Rheodyne, Germany) с обем 50 μ l, флуоресцентен детектор модел 1046 A и CSW 1.7 хроматографски софтуер (DataApex, Czech Republic).

Преди количественото определяне на катехоламините се извършва дериватизация на диализните проби по следния протокол:

- ▲ добавяне на вътрешен стандарт (1.0 mM норлевцин в 0.1 M солна киселина)
- ▲ миксиране за 20s
- ▲ дериватизация на пробите с флуоресцентен маркер 3 mM Fmoc-OBt (9-флуоренилметил 1 - бензотриазолил карбонат).
- ▲ инкубиране на стайна температура за 20 мин на ротатор (Snijders, Tilburg, The Netherlands).
- ▲ прекъсване на дериватизиращата процедура чрез добавяне на 30 μ l солна киселина.

Така обработените проби се съхраняват при температура 4° C. За анализ се използват по 50 μ l от всяка проба.

Разделянето на катехоламини и аминокиселини се осъществява на колона Hypersil C18, 250 mm x 4.6 mm i.d. и 5 μ m размер на частиците (Hewlett-Packard, Germany), чрез използване на двоен градиент при скорост на потока 1.5 ml min⁻¹. Елуент А представлява 20 mM амониев ацетат с 5 mM дибутиламин съдържащ 5 % (v/v) ацетонитрил (pH 6.30). Елуент В предствлява смес 95 / 5 % (v / v) от ацетонитрил и елуент А. И двата елуента се филтрират през мембрани с големина на порите 0.45 μ m (Hewlett-Packard) и сонифицират с ултразвук.

3.3.3. Експериментален модел на Паркинсонова болест

За създаването на експериментален модел на болестта на Паркинсон се използват мъжки плъховете от породата Wistar с тегло 130-180 гр. Животните се анестезират с chloral hydrate (400 mg / kg живо тегло, i.p) и се фиксират на стереотаксичен апарат. След отпрепарирание на меките тъкани на главата в париеталните области и премахване на периоста, черепните кости бяха пробивани с бормашина от дясно на средната линия при

координати съответстващи на десен стриатум: AP = + 0.2; LR = - 3.0; H = -5.6 (Pallegrino and Cushman 1967). Следваше стереотаксично и унилатерално въвеждане на токсина 6-OHDA (20 µg \ 20 µl) в десен стриатум. Раната се затваряше с неръждаеми скоби, като животните се оставяха да се възстановят преди да бъдат върнати в клетките.

След операцията, животните имаха 21 дена възстановителен период.

3.3.3.1. Въвеждане на веществата и експериментални групи

Исходните вещества, разтворени „ex tempore” се инжектираха стереотаксично, унилатерално и еднократно в десен стриатум. За целта се използваше спринцовка Hamilton и скорост на въвеждане 1 µl / min. Инжекционната игла се оставяше на мястото за още 2 минути преди да се изтегли.

Опитните животни са разделени в следните експериментални групи:

I група Здрави контроли

0.9% NaCl (2 µl) - стереотаксично инжектиран в десен стриатум.

II група Групата на паркинсонците

6-OHDA (20 µg / 2 µl) - стереотаксично инжектиран в десен стриатум

III група VIP-тертираната група

6-OHDA (20 µg / 2 µl) + VIP (13 µl / 2 µl) - стереотаксично инжектирани в десен стриатум.

В последната група III, VIP се прилагаше 15 минути след инжектирането на невротоксина.

3.3.3.2. Верификация на модела

Стереотаксичното въвеждане на токсина в десен стриатум предизвиква специфично увреждане на допаминергичната нигростриатна система.

Верификацията на модела се извършва чрез въвеждане на лекарства, стимулиращи допаминовите рецептори, като апоморфин. Въвеждането на апоморфина предизвиква типично асиметрично кръгово моторно поведение, чиито магнитут при гризачи зависи от степента на увреждане на нигростриатарната система и се дължи на физиологичния дисбаланс между лизирания и нелизирия стриатум (Przedborski et al., 1995; Ungerstedt and Arbuthnott, 1970; Nefti et al., 1980). Количественото определяне на това въртеливо

движение се използва за оценка на антипаркинсоновия потенциал на новите лекарства и за верификация на модела (Jiang et al., 1993).

Три седмици след лезията животните се тестват за наличието на контралатерална ротация. Животните се инжектират подкожно с 0.5 mg / kg апоморфин 1 min преди теста, който се състои в преброяване на контралатералните ротации в следващите 30 min. При контролните животни не би трябвало да има ротация при използваните дози апоморфин.

3.3.3.3. Анатомична верификация

След приключване на експериментите, животните се инжектират с 1 μ l метиленово синьо (2 %) в десен стриатум с цел хистологична верификация на стереотаксичните попадения. Експерименталните данни, получени от животни при които изследваните вещества са били неточно инжектирани се изключват от по-нататъшната обработка на резултатите.

3.3.3.4. Аналитични методи за изследване

Определяне на белтък. За определяне на белтъчното съдържание в пробите беше използван метода на Лоури (Lowry et al., 1951).

Принципът на метода е, че в алкална среда медта образува комплексна сол с ароматните аминокиселини тирозин и триптофан. Полученият комплекс дава синьо оцветяване с реактив на Фолин, като интензивността на оцветяването е пропорционална на количеството на белтък в пробата.

Необходими реактиви:

Реактив А: 2 % разтвор на Na_2CO_3 в 0,1 N Na OH;

Реактив Б: 10 % К-Na-тартарат ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

Реактив В: 20 % разтвор на $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Реактив Г: приготвя се от 1мл. Реактив Б, 0,25 мл. Реактив В и се долива до 10 мл с бидестилирана вода;

Реактив Д: приготвя се от 50 части реактив А и една част реактив Г.

Реактив Е: Приготвя се от реактива на Фолин, разреден с бидестилирана вода до 1N разтвор.

Начин на определяне: Към 2 мл от изследвания разтвор се добавят 2 мл от реактив Д. След 10 мин инкубация се добавя по 0.2 мл реактив на Фолин и отново се разбърква. След 30 мин инкубация на стайна температура се измерват пробите спектрофотометрично на 700 nm.

Количеството на белтъка се определяше по калибровъчна крива, получена с говежди серумен албумин – Pentex USA.

3.3.3.5. Определяне на прекисно окисление на липидите в хомогенати от мозък

Нивото на липидна пероксидация беше определяно с помоща на ТБК (тиобарбитурова киселина) тест (Hunter et al., 1963).

Принцип: Методът се основава на реакция на ТБКс крайни продукти на прекисното окисление на липидите, които се получават при декомпозирането на хидроперексидите на ненаситените (с три или повече двойни връзки) мастни киселини. При висока температура и в кисела среда се образува цветен комплекс - малонов диалдехид (MDA) с максимум на поглъщане 532 nm.

Необходими реактиви:

0,15 М КСl, 10 mM К PO₄, рН 7.2;

40% трихлороцетна киселина (ТНО);

5 N солна киселина (НСl)

2% натриев тиобарбитурат (ТВА)

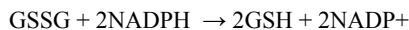
Начин на определяне: Постядреният хомогенат се разрежда така, че да се получи разтвор с концентрация 1mg белтък/мл. Следва инкубация на пробите на 37° С за 1 час. Към пробите от 1 мл се долива 0.6 мл смес от ТНО:НСl:ТВА в съотношение 2:1:2 и се вари на водна баня за 15 мин. След охлаждане и центрофугиране на 3000 оборота за 5 мин пробите се измерват на 532 nm и 600 nm на спектрофотометър.

Количеството на ТБК-реагиращ материал се изчислява като нмол MDA/мг белтък, използвайки моларен екстинкционен коефициент $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.3.6. Определяне на ензимната активност на глутатион редуказата (GSSG-Red).

Използван бе методът на Pinto and Bartley (1969)

Принцип: ензимът катализира следната реакция:



Необходими реактиви:

50 mM калиево фосфатен буфер, pH 7.0

2 mM EDTA

0.2 mM NADPH

2.5 mM GSSG

Начин на определяне: Количеството, измерено на 340 nm се изразява в наномола NADPH, окислен за мин/на мг белтък, като се използва моларен екстинкционен коефициент $6.22 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

3.3.4. Експериментален модел на остро възпаление

Широко прието е мнението, че синдромът на системния възпалителен отговор (SIRS) е един от механизмите за възникване на синдрома на полиорганната недостатъчност (MODS) при човек, който се наблюдава след травма, изгаряния, панкреатити, сепсис и други (Seely and Christou, 2000). При SIRS активирането на вродения и придобит имунитет води до генерализиран възпалителен процес, характеризиращ се с “възрив от цитокини” (Volman et al., 2004; Sharma et al., 2011). Все още не са напълно изяснени ендогенните регулаторни имунни механизми, насочени срещу SIRS. Един от най-широко използваните експериментални модели на SIRS/MODS е зимозан-индуцираното генерализирано възпаление, което имитира последователността и интензитета на несептичен MODS при човек (Volman et al., 2005, 2005; Goris et al., 1986; Jansen et al., 1997).

Остро системно възпаление предизвикахме чрез интраперитонеално (i.p) инжектиране на 1 mg/kg зимозан в женски BALB/c мишки. Токсинът беше предварително разтворен в дестилирана вода и автоклавиран в продължение на 30 минути.

3.3.4.1. Клинична картина на остро системно възпаление

Интраперитонеалното инжектиране на зимозан (1 mg / kg) води до остро системно възпаление, развиващо се в три фази:

I фаза (до 2 дни от интервенцията). Това е острата фаза на възпалението. Животните изглеждат силно отпаднали, с чревни разстройства, настръхнала козина и висока температура. Теглото им намалява драстично. Смъртността в тази фаза е 10-35 %.

II фаза (между 3-5 ден от интервенцията). Състоянието на преживелите животни се подобрява. Липсват стомашно-чревни проблеми, настръхване на козината, жизнеността се повишава, температурата се нормализира, животните напълняват и няма смъртност.

III фаза (след 7^{ма} ден). Това е фазата на полиорганната недостатъчност (Jansen et al., 1997). Болестта на този етап се характеризира с летаргия, учестено дишане, прогресивна загуба на тегло и постепенно намаление на температурата. Смъртността е в рамките на 20-30 %.

3.3.4.2. Въвеждане на веществата и експериментални групи

Исходните вещества, разтворяни „ex tempore” се инжектираха както следва: VIP (200 nmol / kg) бе въведен интравенозно, а Зимозан (1 mg / kg) и анти-VIP (200 nmol / kg) са въведени интраперитонеално. Използваният VIP антагонист е VIP₆₋₂₈.

Животните бяха разделени в следните експериментални групи:

I група: Здрави контроли. Животните от тази група бяха третирани единствено с физиологичен разтвор.

II група: VIP

III група: анти - VIP

IV група: Зимозан

V група: VIP + Зимозан

VI група: анти -VIP + VIP + Зимозан

VIP и зимозан в VI група опитни животни бяха инжектирани едновременно 30 минути след въвеждането на VIP-антагониста=

Всяка група се състоеше от по 10 животни.

Кръв, перитонеална течност, черен дроб и бъбреци за изследване са вземани на определени етапи от индуцирането на шока.

3.3.4.3. Количествено определяне на цитокини и хемокини след зимозан-индуцирано остро възпаление

Експерименталните животни се евтаназираха чрез цервикална дислокация. Перитонеалната течност се получаваше чрез промиване на коремната кухина с 2 ml стерилна среда RPMI - 1640 на 4^{та} час от инжектирането на зимозан.

Нивата на различните медиатори в плазмата и перитонеалната течност се измерваха чрез ензимно-свързан имуносорбентен метод (ELISA). Минималната концентрация, която може да бъде определена по този метод е 50 pg/ml за TNF- α , 20 pg/ml за IL-10, 25 pg/ml за IFN γ , 16 pg/ml за RANTES и 8 pg/ml за MIP-1 α .

3.3.4.4. Изолиране на перитонеални макрофаги след зимозан-индуцирано остро възпаление

Изолирането на перитонеалните макрофаги ставаше 24 часа след инжектирането на зимозан чрез промиване на перитонеалната кухина с 2 ml стерилна среда RPMI-1640. Макрофагите се разреждаха до концентрация 1×10^6 клетки/ml в среда RPMI-1640, съдържаща 5 % фетален телешки серум, пеницилин (100 EU /ml) и стрептомицин (100 mg/ml) и се инкубираха в 96-ямови плаки в обем от по 100 μ l за 1 час при 37 °C, 5 % CO₂. Следваше двукратно промиване с PBS и отстраняване на неприлепналите клетки.

3.3.4.5. Определяне на азотни окиси от макрофаги

Установено е, че фагоцитиращите клетки отделят окиси в отговор на стимулация от опсонизирани частици. Затова прилепналите макрофаги в концентрация 1×10^6 клетки / ml (получени както е описано в т 3.3.4.4) се активираха за 18 часа със зимозан (10 μ g / ml) в присъствието на VIP (1 x 10⁻⁸ M) при 37 °C, 5% CO₂. Някои от клетъчните култури се претретираха с анти-VIP (1 x 10⁻⁸ M) за 15 min след което се стимулираха със зимозан (10 μ g / ml) в присъствието на VIP (1 x 10⁻⁸ M). След центрофугиране при 1200 x g за 10 мин, супернатантите се събираха и концентрацията на нитрити се определяше чрез метода на Griess (Griess et al., 1879). Абсорбцията се измерваше при 550 nm на микроплаков ридер. Концентрацията на NO се изчисляваше в ng/ml спрямо стандартна линейна крива, построена според концентрацията на натриев нитрит (0-1000 ng/ml) и съответните стойности на абсорбцията.

3.3.4.6. SDS-PAGE електрофореза

За целите на блот анализа, серумните проби се разреждаха до 1 mg/ml белтък в SDS лизиращ буфер. Пробите се загряваха за 5 мин на 95° C, като 20 µl / линия / проба се натоварваше върху 10 % акриламид-бисакриламиден гел. SDS-PAGE електрофорезата протичаше за 1.30 часа при 200 V (60 mA).

3.3.4.7. Имуноблот

След електрофорезата, протеините се прехвърляха от гела върху нитроцелуозна мембрана (Protran BA 85, Schleicher & Schuell) за 1 час при 100 V (300 mA). Специфичното определяне на α 1-антитрипсин протичаше по следния протокол:

- измиване на мембраната с PBS-TRIS буфер за 5 минути
- блокиране с 0.5 % Tween 20/PBS-TRIS буфер за 1 час на стайна температура
- измиване на мембраната с PBS-TRIS буфер
- инкубиране с α 1-антитрипсин антитела (разредено 1:1000) за 3 часа на стайна температура
- трикратно измиване на мембраната с PBS-TRIS буфер
- инкубация с HPR-конюгирано антимишо IgG анти тяло (разредено 1:1000) за 1 час на стайна температура
- визуализиране на блота чрез 4-хлор-1-нафтол (4-chloro-1-naphthol)

3.3.4.8. Определяне на биохимични показатели в кръвта след зимозан-индуцирано остро възпаление

Нивата на аланин-аминотрансферазата (АЛАТ), аспартил-аминотрансферазата (АСАТ), билирубин, глюкоза и креатинин в плазмата се определяха с търговски колориметрични лабораторни китове (Dialab, GmbH, Austria) на 24^{ия} час след инжектирането със зимозан.

3.3.4.9. Органична дисфункция след зимозан-индуцираното остро възпаление

Теглото на черен дроб, далак, бял дроб и бъбреци от 5 животни се измерваха 24 часа след инжектирането със зимозан. Органното тегло се изчисляваше като процент от цялото тегло на тялото (относително органно тегло).

3.3.4.10. Хистопатологично изследване на черен дроб след зимозан-индуцирано остро възпаление

На 7^{ия} ден след инжектирането на зимозан, черният дроб се отстраняваше и фиксираше за 48 часа в 10 % PFA / PBS (pH 7.4) след което се включваше в парафин при използването на следния протокол (метод по Hofman, 2002):

Органите се поставят в хистологични касети и се дехидрират с възходяща редица етанол (70 %, 80 %, 95 % и 100 %), последвано от ксилен и течен парафин (56-58° C). Срези с дебелина от 7 μ m, получени на ротационен микротом с нископрофилни метални ножове, се поставят на предметни стъкла, предварително третирани с 0.01% разтвор на поли-L-лизин за 1 час и се изсушават в термостат при 56° C.

Срезите се депарафинират с ксилен и низходяща редица от етанол (100 %, 95 %, 80 % и 70 % етанол). След рехидратирането, срезите се оцветяват с хематоксилин и еозин. Хематоксилинът оцветява отрицателно заредените нуклеинови кислини (ядрото и рибозомите) в синьо, а еозинът оцветява протеините в розово. Оцветените срези се наблюдават на светлинен микроскоп (BM-180 T/PL, Воецо, Hamburg, Germany) при увеличение 1x100 или 1x400. Препаратите се заснемат с микроскопска камера и се прехвърлят в Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Munich, Germany).

3.4. Статистическа обработка на данните

Експерименталните данни са представени като средни стойности със съответните им стандартни грешки ($m \pm S.E.M$).

За всеки експеримент нивата на ACh и KA в пробите се представяха в pM/40 минути и като % от базалното ниво. За 100 % се приема средната аритметична стойност от нивата на ACh и KA от поне три проби преди прилагането на изследваните субстанции. Промените в амплитудата на съкратителния отговор на гладкомускулните препарати се

представят в градове и като % от базалното ниво. За 100 % се приемат средното аритметично от амплитудата на поне 3 контролни, електрически предизвикани съкращения. За определена група експерименти за 100 % се приема амплитудата на съкратителния отговор предизвикан от екзогенното въвеждане на ATP или NA.

При статистическата обработка на резултатите е прилаган метода на еднофакторния или двуфакторния дисперсионен анализ (ANOVA). Отделните групи са сравнявани с помощта на post hoc тестовете на Newman-Keuls, Dunnett или *t*-теста на Student-Fisher за двойка данни. Разликите между групите се приемат за достоверни при ниво на значимост $P < 0.05$.

При статистическата обработка на експерименталните данни и построяването на графики е използван софтуерния продукт MS Excel 97 и GraphPad Prism 3.2 (GraphPad Software, Inc., 1992, USA).

3.5. Субстанции

В експерименталните процедури бяха използвани следните субстанции:

Acetylcholine (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)

Acetylcholine esterase (EC 3.1.1.7) (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)

Adenosine triphosphate (ATP, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)

Anti α 1-antitrypsin antibody (polyclonal, Sigma)

Anti-mouse IgG (monoclonal, A4312 Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)

Bilirubine (Dialab GmbH, Austria)

BSA (Sigma - Aldrich Co, St.Louis MO,USA)

Calcium chloride (CaCl₂)

Chloral hydrate (Merck)

4 – chloro – 1 - naphthol (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)

Choline oxidase (EC 1.1.3.17) (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)

Creatine (Dialab GmbH, Austria)

Di - Potassium hydrogen phosphate (K₂HPO₄, Merck)

DTT (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)

EDTA (Merck)

Fetal calf serum (FCS, Sigma - Aldrich Co, St.Louis MO,USA)

Guanitidine (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)
HRP (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)
6-hydroxydopamine-hydrobromide (6-OHDA, Sigma -Aldrich, St. Louis, MO, USA)
IFN- γ (Cytolab, Rehavol, Israel)
IL-10 (Cytolab, Rehavol, Israel)
L-arginine (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)
MgCl₂ (Merck)
MIP-1 α (PreproTech London, UK)
N - (1 - naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)
N – nitro – L - arginine (L-NAME, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)
NaHCO₃ (Merck)
Noradrenaline (NA, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)
p-nitrophenil 1phosphate (pNPP, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)
Paraformaldehyde (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)
Penicillin (Sigma - Aldrich Co, St.Louis MO,USA)
Physostigmine sulfate (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)
Potasium chloride (KCl)
Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄, Merck)
RANTES (PreproTech London, UK)
RPMI-1640 medium (Gibco-BRL, NY, USA)
SDS (Fluka)
Sodium chloride (NaCl)
Sodium nitropruside (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)
Somatostatin 14 (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)
Streptomycin (Sigma-Aldrich Co, St.Louis MO,USA)
Sulfanilamide (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)
Tetrodotoxin (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)
TMA (Merck)
TNF- α (Cytolab, Rehavol, Israel)
VIP (Sigma - Aldrich)
VIP 6-28 (Sigma - Aldrich Co, St.Louis MO,USA)

Zimosan (Sigma - Aldrich Co, St.Louis MO,USA)

Antibody against α 1-antitrypsin (policlonal, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)

3.5.1. Използвани разтвори

Рингеров разтвор (mM; NaCl – 147; KCl – 4.0; CaCl₂ - 1.2)

Разтвор на Тироде (mM; NaCl – 136.90; KCl – 2.68; KH₂PO₄ – 0.5; NaHCO₃ – 11.90; glucose – 5.55; MgCl₂.6H₂O – 1.05; CaCl₂.2H₂O – 1.84)

PBS-TRIS (mM; pH 7.4; NaH₂PO₄ - 10, Tris - 10, NaCl - 0.15 M, 1% β mercaptoethanol).

Реагент на Griess 0.05 % нафталетилендиамин дихидрохлорид, 0,5 % сулфаниламин, 2.5 % о-фосфорна киселина, H₂O.

SDS лизиращ буфер (mM; pH 6.8; Tris-HCl - 187.5, 6 % (w/v) SDS, 30 % glycerol, DTT – 150; 0.03 % (w / v) bromophenol blue и 2 % β mercaptoethanol

IV. Резултати

4.1. Експерименти *in vitro*

4.1.1. Ефекти на VIP върху съкратителната активност на вас деференс от морско свинче и плъх

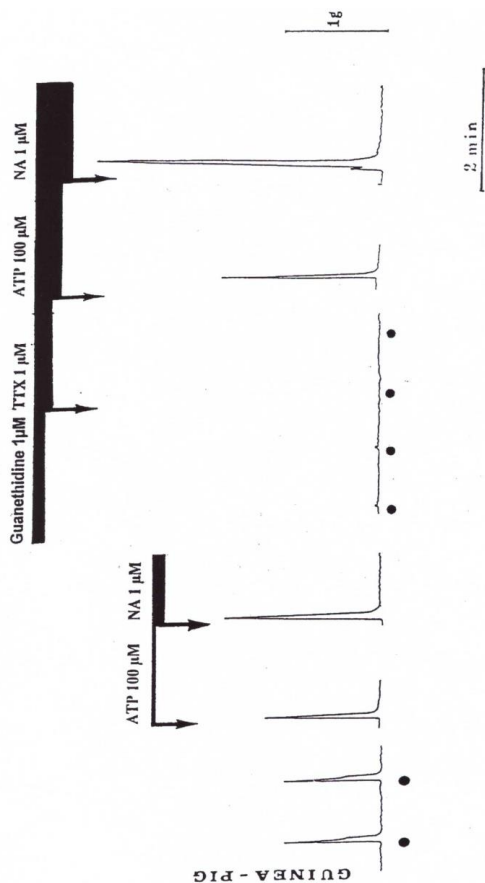
4.1.1.1. Доказване неврогенния характер на електрически-предизвиканата съкратителна активност на вас деференс от морско свинче

Опитите се провеждаха върху изолирана простатна част от вас деференс на морско свинче. Препаратите не показваха спонтанна контрактилна активност.

При полева електрическа стимулация (ПЕС) с параметри: продължителност на импулса 0.5 ms, честота 8 Hz, супрамаксимален волтаж 40 V, 80 пулса през 3 минутни интервали, всички препарати отговаряха бифазно с първоначална кратка, фазична компонента и последваща бавна, тонична компонента (Фиг. 1). Амплитудата на фазичната компонента при контролите обикновено беше по-голяма от амплитудата на тоничната компонента с $39.46 \pm 9.67\%$ ($P < 0.001$, $n = 23$).

В нашите експерименти екзогенното въвеждане на АТР (100 μM) предизвика бърза и монофазна контракция, а на NA (10 μM) един удължен тоничния отговор (Фиг. 1).

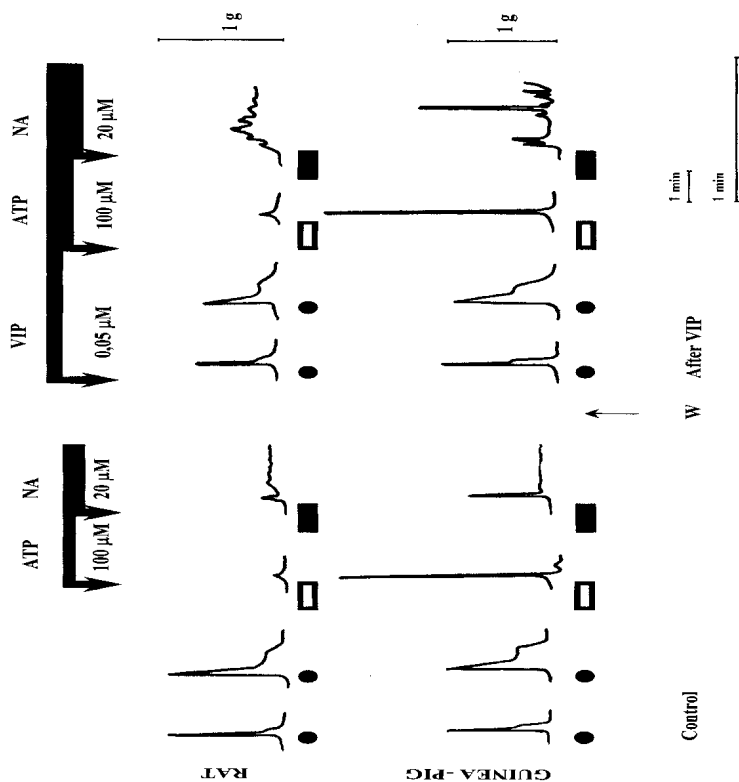
Гванетидинът (30 минути контактено време) и тетродотоксинът (15 минути контактено време) потискат напълно ПЕС-предизвиканите контракции (Фиг. 1), но не премахват миогенно предизвиканите отговори при екзогенно въвеждане на АТФ и NA (Фиг. 1).



Фиг. 1. Оригинален запис на съкратителните отговори на изолирана простатна част от вас деференс на морско свинче при (ПЕС) (●) и екзогенното прилагането на АТФ (100 μM), NA (1 μM) и същите тези отговори в присъствие на гванетидин (1 μM) и ТТХ (1 μM). Въвеждането на екзогенните състанции е отбелязано със стрелки. Параметри на ПЕС: продължителност на импулса 0.5 ms, честота 8 Hz, супрамаксимален волтаж 40 V, 80 пулса през 3 мин. интервали

4.1.1.2. Ефект на VIP върху съкратителния отговор на вас деференс от морско свинче и плъх при електрическа стимулация и екзогенното въвеждане на ATP и NA

В нашите експерименти екзогенното прибавяне на VIP (0.05 μM) потиска електрически-предизвиканите отговори, не повлиява ATP-предизвиканите отговори и потенциера NA предизвиканите контракции при морско свинче (Фиг. 2).



Фиг. 2. Оригинален запис на съкратителните отговори на изолирана простатна част от вас деференс на морско свинче и плъх при (ПЕС) (●), при екзогенното въвеждане на ATP (100 μM) и NA (20 μM) в контрола и след въвеждането на VIP (0.05 μM). Прилагането на екзогенните субстанции е отбелязано със стрелки. Параметри на ПЕС: продължителност на импулса 0.5 ms, честота 8 Hz, супрамаксимален волтаж 40 V, 80 пулса през 3 мин интервали

4.1.1.3. Ефект на VIP върху първата и втората компонента на електрически-предизвикания съкратителен отговор на вас деференс от морско свинче и плъх

VIP (1, 10 и 100 nM) потиска и двете компоненти на неврогенно-предизвиканите съкратителни отговори при морско свинче и плъх.

При морско свинче инхибиторният ефект показва зависимост от концентрацията и е по-ясно изразен върху първата в сравнение с втората компонента. При VIP 10 nM фазичната компонента се редуцира с $45.12 \pm 8.91\%$ ($P < 0.05$, $n = 6$), а тоничната с $23.39 \pm 16, 72\%$ ($n = 6$) (Фиг. 3А) в сравнение с контролата, приета за 100%. Инхибиторният ефект на VIP продължава до края на експеримента (повече от 40 минути).

При плъх прилагането на VIP (1, 10 и 100 nM) предизвиква слабо и статистически недостоверно понижение в амплитудата на първата и втората компонента на електрически-предизвиканите съкратителни отговора (Фиг. 3В).

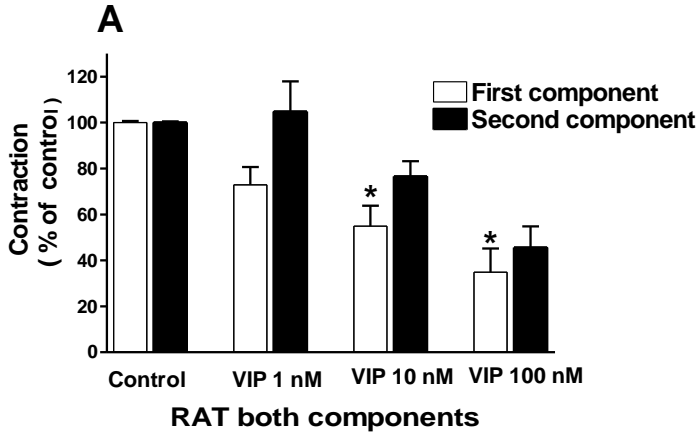
4.1.1.4. Ефекти на VIP върху АТР-предизвиканите контрактилни отговори на вас деференс от морско свинче

Екзогенното въвеждане на VIP (10 nM) показва слаб инхибиторен ефект върху АТР (100 μ M) предизвикания контрактилен отговор (Фиг 4А). Редуциращият ефект на VIP (10 nM) е $20.99 \pm 10.19\%$ ($P < 0.05$, $n = 14$).

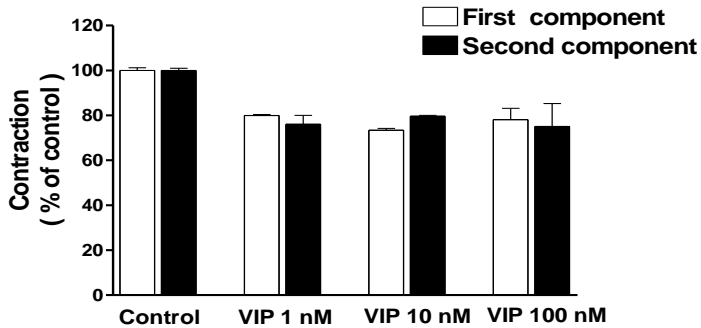
4.1.1.5. Ефекти на VIP върху NA-предизвиканите контрактилни отговори на вас деференс от морско свинче

Екзогенното въвеждане на VIP (10 nM) предизвика стимулиращ ефект върху NA (10 μ M) предизвикания контрактилен отговор на вас деференс от морско свинче – увеличение с $89.86 \pm 30.08\%$ ($P < 0.01$, $n = 16$) (Фиг 4В).

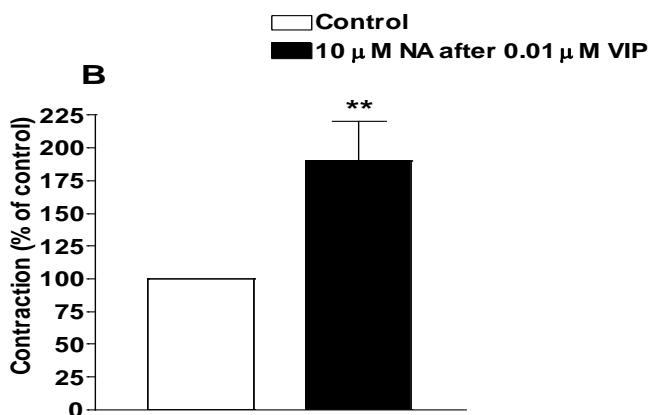
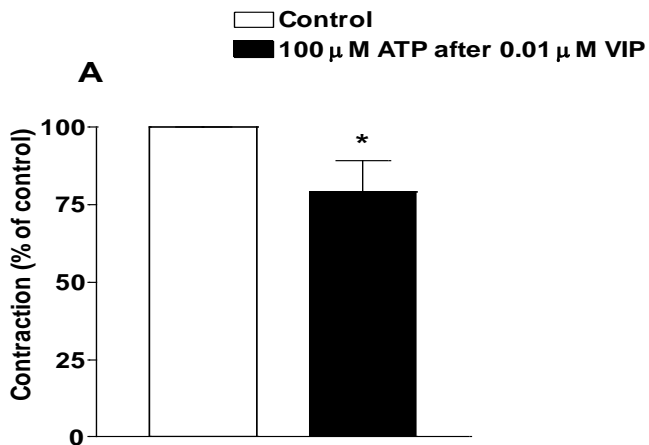
GP both components



B



Фиг. 3. Първата (бели колонки) и втората компонента (черни колонки) на съкратителния отговор на вас деференс от морско свинче (11 A) и плъх (11 B) в контроли и в присъствие на VIP. Съкратителният отговор е изразен като процент от средната аритметична стойност (приета за 100%) на първите 3-4 контролни електрически-предизвикани съкращения. ПЕС е с параметри: продължителност на импулса 0.5 ms, честота 8 Hz, супрамаксимален волтаж 40V, 80 пулса през 3 минутни интервали. Представени са средните стойности и грешката на средната аритметична стойност от 5-7 експеримента. Статистическия анализ беше осъществен чрез Student's t-test. Разликите между първата и втората компонента са отбелязани както следва: * $P < 0.05$



Фиг. 4. Ефект на VIP (10 μ M) върху контрактилните отговори на вас деференс от морско свинче, предизвикани от екзогенното въвеждане на ATP (100 μ M) - фиг 12 A или NA (10 μ M) - фиг 12 B. Контрактилните отговори предизвикани от екзогенното въвеждане на ATP или норадrenalин са взети за 100 %. Всеки бар представлява средните стойности и грешката на средната аритметична стойност от 6 до 16 експеримента. Статистическия анализ беше осъществен чрез Student's t-test. Значимите разлики между експерименталните групи са отбелязани както следва: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

4.2. Експерименти *in vivo*

4.2.1. Ефекти на VIP върху класическите невротрансмитерни системи в мозъчна кора и хипокамп

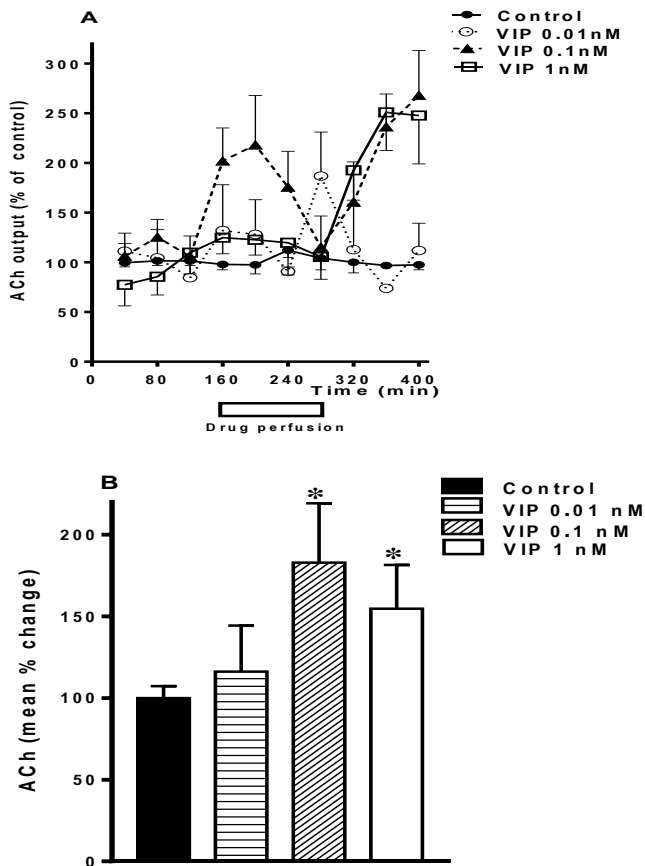
4.2.1.1. Ефект на VIP върху базалното освобождаване на ацетилхолин в мозъчна кора на плъх

Базалното ниво на ACh в микродиализен перфузат от мозъчна кора плъх е 6.51 ± 0.34 pM/40 min ($P < 0.05$, $n = 16$) и остава относително постоянно по време на целия експеримент (повече от 7 часа).

Локалното прилагане на VIP (0.01, 0.1 и 1 nM) през диализна мембрана, имплантирана в мозъчна кора на плъх, повишава екстрацелуларните нива на ацетилхолина (Фиг. 5А и 5В). Максимален и статистически достоверен стимулиращ ефект от 87.54 ± 37.80 % ($P < 0.05$, $n = 5$) се отчита при прилагането на 0.1 nM VIP (Фиг. 5В). За сравнение, стимулиращите ефекти на VIP (0.01 nM и 1nM) са съответно 17.37 ± 27.29 % ($n = 5$) и 60.67 ± 28.15 % ($P < 0.05$, $n = 5$).

Промени в поведението на животните по време на експериментите не се наблюдават.

В предишни наши изследвания сме показали, че по-високи концентрации на VIP (0.1 и 1 μ M) имат потискащ ефект върху освобождаването на ACh в мозъчна кора на плъх (Lazarova *et al.*, 2001).



Фиг. 5. А) Ефект на VIP върху базалното освобождаване на ACh в мозъчна кора на плъх в контрола (●) и след локалното въвеждане на VIP в концентрации 0.01 nM (○), 0.1 nM (▲) и 1 nM (□). На ординатата са представени нивата на ACh като процент от средното аритметично на първите четири базални проби (средно аритметично ± SEM от не по-малко от пет различни животни за всяка група). На абсцисата е нанесено времето изминало от началото на събирането на пробите, което се извършва на 40 минутни интервали. Правоъгълникът под абсцисата показва периода на въвеждане на VIP (160-280 мин). Вижда се, че VIP повишава освобождаването на ACh. **Б)** Представени са средните стойности на площите под кривите (изчислени като % спрямо контролите). Изчисленията са направени за периода от 160 до 400 минута. Ясно се вижда стимулиращия ефект на VIP върху отделянето на ACh. Значимите разлики между експерименталните групи се изчисляват чрез сравняване площите под кривите чрез one-way ANOVA ($F_{3,25} = 3.13$, $P < 0.05$) последван от теста на Dunnett ($*P < 0.05$ срещу контролите).

4.2.1.2. Ефект на VIP върху базалното освобождаване на ацетилхолин в хипокамп на плъх

Базалното ниво на ACh в микродиализен перфузат от хипокамп на плъх е 5.78 ± 0.26 pM / 40 min (n = 16 плъха), и остава относително постоянно по време на целия експеримент (повече от 7 часа).

Локалното въвеждане на VIP (0.01, 0.1 и 1 nM) през диализна мембрана, имплантирана в хипокамп на плъх, доза-зависимо повиши екстрацелуларните нива на ACh (Фиг 6А, 6В). Максимален и статистически достоверен ефект от 97.47 ± 46.24 % ($P < 0.05$, n = 7) се отчита при прилагане на 1 nM VIP (Фиг 6В). Стимулиращите ефекти на VIP (0.01 и 0.1 nM) са съответно 15.37 ± 25.39 % (n = 6) и 25.27 ± 37.80 % (n = 6).

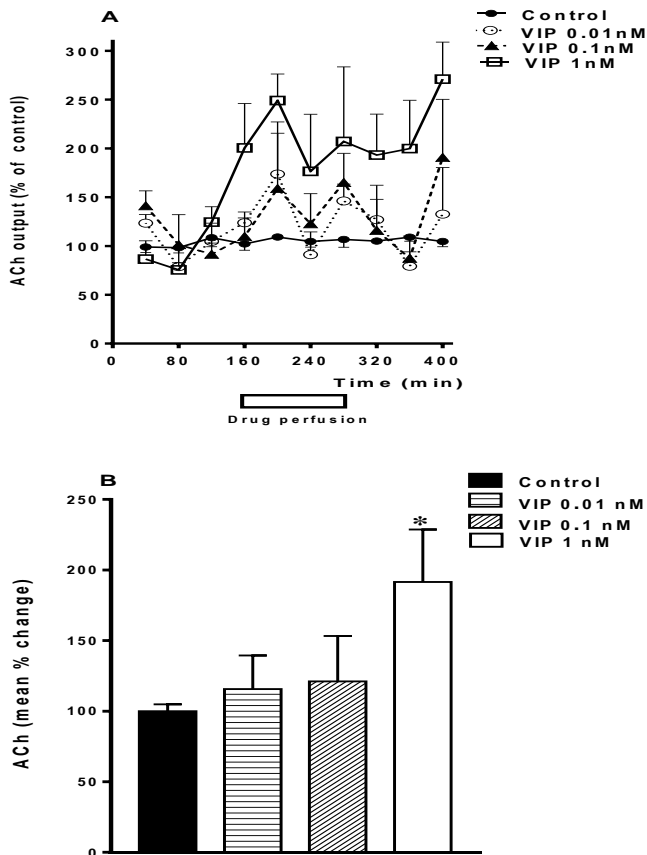
Промени в поведението на животните по време на експериментите не се наблюдаваха.

4.2.1.3. Ефект на VIP върху базалното освобождаване на допамин в мозъчна кора на плъх

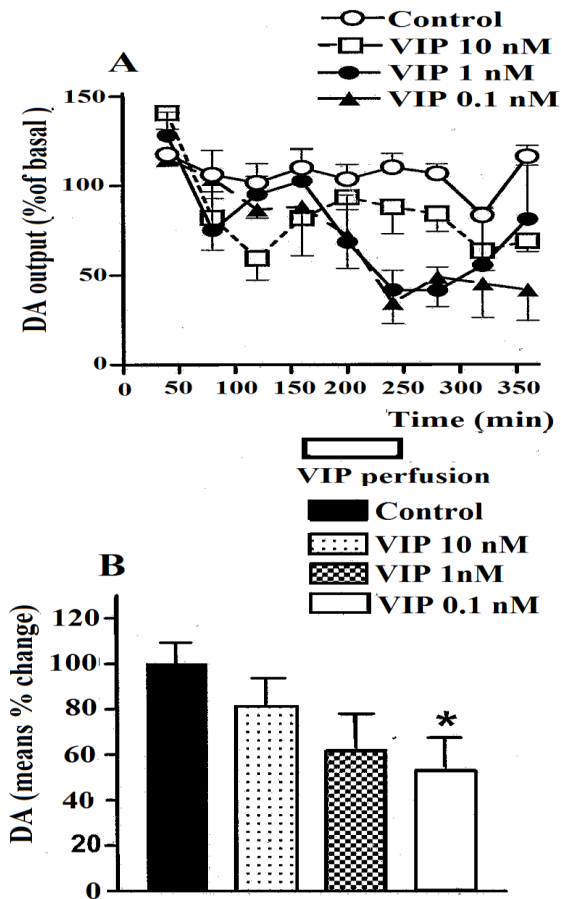
Базалното ниво на допамина в микродиализен перфузат от мозъчната кора на плъх е 2.98 ± 0.92 pmol/40 min (n = 16) и остава сравнително постоянни по време на целия експеримент (до 8 часа).

Локалното прилагане на VIP (0.1, 1 и 10 nM) през диализна мембрана, имплантирана в мозъчната кора на плъх предизвика доза-зависимо понижение в екстрацелуларните нива на допамина (Фиг 7А и 7В). Максимален и статистически достоверен ефект от 65.59 ± 2.57 % ($P < 0.05$, n = 7) се отчита при въвеждането на 0.1 nM VIP (Фиг 7В).

Промени в поведението на животните по време на експеримента не се наблюдаваха.



Фиг. 6. А) Ефект на VIP върху базалното освобождаване на ACh в хипокамп плъх в контрола (●) и след локално въвеждане на VIP в концентрации 0.01 nM (○), 0.1 nM (▲) и 1 nM (□). На ординатата са представени нивата на ACh като процент от средното аритметично на първите четири базални проби (средно аритметично ± SEM от не по-малко от шест различни животни за всяка група). На абсисата е нанесено времето изминало от началото на събирането на пробите, което се извършва на 40 минутни интервали. Правоъгълникът под абсисата показва периода на въвеждане на VIP (160-280мин). Вижда се, че VIP повишава освобождаването на ACh в хипокампа. В) Представени са средните стойности на площите под кривите (като % спрямо контролите). Изчисленията са направени за периода от 160 до 400 минута. Ясно се вижда стимулиращия ефект на VIP върху отделянето на ACh. Значимите разлики между експерименталните групи се изчисляват чрез сравняване площите под кривите чрез one-way ANOVA ($F_{3,25} = 3.13, P < 0.05$) последван от теста на Dunnett ($*P < 0.05$ срещу контролите).

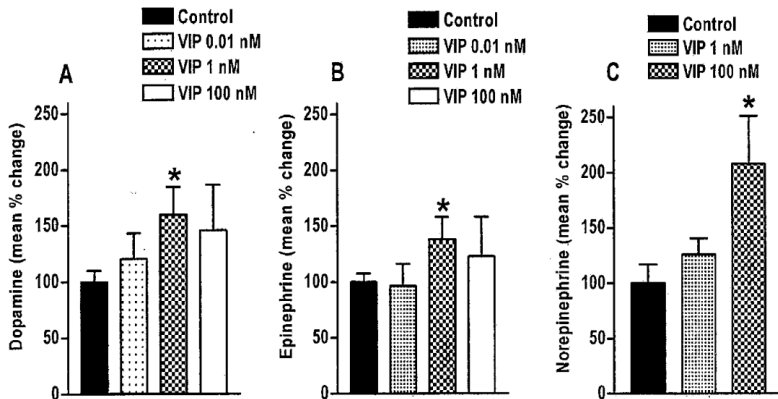


Фиг. 7. А) Ефект на VIP върху базалното освобождаване на допамин в мозъчната кора на плъх в контрола (○) и след локалното въвеждане на VIP в концентрации 0.1nM (▲), 1 nM (●) и 10 nM (□). На ординатата са представени нивата на DA като процент от средното аритметично на първите четири базални проби (средно аритметично ± SEM от не по-малко от шест различни животни за всяка). На абсцисата е нанесено времето изминало от началото на събирането на пробите, което се извършваше на 40 минутни интервали. Правоъгълникът под абсцисата показва периода на въвеждане на VIP (160-240мин).Б) Представени са средните стойности на площите под кривите (като % спрямо контролите) изчислени за периода от 160 до 360 минута. Ясно се вижда инхибиращия ефект на VIP върху отделянето на DA. Значимите разлики между експерименталните групи се изчисляват чрез сравняване площите под кривите чрез one-way ANOVA ($F_{3,25} = 3.13$, $P < 0.05$) последван от теста на Dunnett ($*P < 0.05$ срещу контролите).

4.2.1.4. Ефект на VIP върху базалното освобождаване на допамин, норепинефрин и епинефрин в хипокамп на плъх

Базалните нива на допамина, норепинефрина и епинефрина в микродиализен перфузат от хипокамп на плъх са съответно 6.68 ± 1.09 pmol / 40 min ($n = 6$), 5.90 ± 1.81 pmol / 40 min ($n = 6$) и 15.84 ± 0.9 pmol / 40 min ($n = 6$) и оставаха сравнително постоянни по време на целия експеримент (до 6 часа).

Локално въвеждане на VIP (0.1, 1 и 100 nM) през микродиализната мембрана, имплантирана в хипокамп на плъх предизвиква повишение в екстрацелуларните нива на допамина, норепинефрина и епинефрина (Фиг 8).



Фиг 8. Ефект на VIP върху базалното освобождаване на допамин (A), епинефрин (B) и норепинефрин (C) в хипокамп на плъх. Освобождаването на катехоламини е представено в проценти спрямо средната аритметична стойност на първите четири базални проби. VIP (0.1 до 100 nM) беше въвеждан в продължение на 40 минути след събирането на първите четири базални проби. Ясно се вижда стимулиращия ефект на VIP върху отделянето на DA. Представени са средните аритметични стойности и техните грешки от поне 4 експеримента във всяка група. Статистически достоверните разлики между групите са определяни с помощта на t-теста на Student, като $*P < 0.05$ спрямо контролната група.

Максимално повишение с 59.61 ± 1.48 % ($P < 0.05$, $n = 7$) и 38.19 ± 1.46 % ($P < 0.05$, $n = 7$) съответно за допамина и епинефрина се наблюдава при прилагането на 1 nM VIP (Фиг 8A и 8B). VIP (100 nM) повиши отделянето на норепинефрин със 108.04 ± 20.58 % ($P < 0.05$, $n = 7$), докато при 1 nM VIP повишението е едва 26.11 ± 1.19 % в сравнение с контролите (Фиг. 8C).

Промени в поведението на животните по време на експеримента не се наблюдаваха.

4.2.2. Ефекти на VIP върху антиоксидантния статус в мозък на плъх с експериментален модел на Паркинсонова болест

4.2.2.1. Ефекти на VIP върху нивата на липидна пероксидация и глутатион редуктазната активност в мозък на плъх с експериментален модел на Паркинсонова болест

Нивата на липидна пероксидация и глутатион редуктазната активност в десен и ляв хипокамп, стриатум и мозъчна кора при контролната група животни и при такива с модела на Паркинсонова болест, в отсъствие и присъствие на VIP, бяха отчитани на 21 ден след хирургичната интервенция.

Таблица 1. Нива на липидна пероксидация в десен и ляв хипокамп, стриатум и мозъчна кора на 21 ден след лезията

МОЗЪЧНА СТРУКТУРА	ЛЯВ			ДЕСЕН		
	контроли	ПБ	ПБ + VIP	контроли	ПБ	ПБ + VIP
Кортекс	10.49±2.25	23.91±4.73*	14.41±2.04 [#]	9.71±2.25	20.07±4.94 *	17.48±4.12 [#]
Стриатум	15.01±3.16	23.76±2.25*	16.84±5.98	13.75±3.16	19.26±2.09	12.86±2.89 [#]
Хипокамп	11.34±3.71	18.79±6.61 *	13.65±1.76	11.50±3.89	19.48±6.15	18.32±5.51

Нивата на липидна пероксидация в мозъчните хомогенати е определяна спектрофотометрично след 60 мин инкубация при 37° С. Количеството на ТБК-реагиращ материал е изчислен като нмол MDA/мг белтък, използвайки моларен екстинкционен коефициент $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Данните са представени като средни стойности ± SEM, n = 5 плъха. * $P < 0.05$ vs. контролите; [#] $P < 0.05$ vs групата на Паркинсонова болест в отсъствие на VIP.

Нивата на липидната пероксидация (Табл. 1) и глутатион редуктазната активност (Табл. 2) са повишени в изследваните мозъчни структури на животни с експериментален модел на болест на Паркинсон. Третирането с VIP има инхибиращ ефект върху нивата на липидна пероксидация и няма съществен ефект (много слаб инхибиращ ефект) по отношение активността на ензима глутатион редуктаза.

Таблица 2. Нива на глутатион редуктазната активност в десен и ляв хипокамп, стриатум и мозъчна кора на 21 ден след лезията

МОЗЪЧНА СТРУКТУРА	ЛЯВ			ДЕСЕН		
	контроли	ПБ	ПБ+VIP	контроли	ПБ	ПБ+ VIP
Кортекс	8.17±0.84	15.60±4.41*	10.35±3.24	9.28±1.36	11.64±2.43	8.21±3.10
Стриатум	8.85±1.75	10.01±0.42	10.87 ±2.64	10.56±0.32	13.78±1.04	12.95±2.47
Хипокамп	9.67±1.18	12.51±3.57	10.61±3.13	9.09±0.28	16.05±3.77*	10.61±1.83 [#]

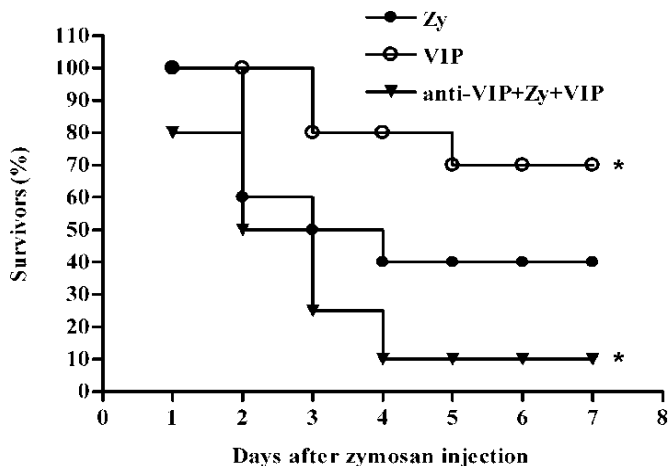
Ензимната активност на глутатион редуктазата (GSSG-Red) е измерена спектрофотометрично и е изчислен като наномола NADPH, окислен за мин/на мг белтък, като се използва моларен екстинкционен коефициент $6.22 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Данните са представени като средни стойности \pm SEM, n = 4 плъха. * $P < 0.05$ vs. контролите; [#] $P < 0.05$ vs групата на Паркинсонова болест в отсъствие на VIP.

4.2.3. Ефекти на VIP върху острата фаза на възпалението, предизвикано от зимозан

4.2.3.1. Ефект на VIP върху преживяемостта при модел на зимозан-индуцираното остро възпаление

Интраперитонеалното инжектиране на мишки от породата BALB/c със зимозан (ЗИ, 1 mg / kg) предизвиква състояние, характеризиращо се с коагулация, множествена органна дисфункция и високо ниво на смъртност.

До 7^{ия} ден от началото на експеримента, смъртността на зимозан-инжектираните животните бе 60 %, докато при тези инжектирани и с VIP само 30 % (Фиг. 9). Смъртността в групата анти – VIP + VIP + ЗИ за същия период от време бе 90 %.



Фиг. 9. Преживяемост при мишки със зимозан-индуцираното остро възпаление. VIP (200 nmol / kg) инжектиран интравенозно, едновременно със зимозан или 30 минути след анти-VIP (200 nmol / kg), въведен интраперитонеално. Мишките са в групи по 20. Експериментът е повторен три пъти. ****P < 0.01** vs зимозан-третираната група, двуфакторен ANOVA тест.

4.2.3.2. Ефекти на VIP върху нивата на възпалителните хемокини MIP - 1 α и RANTES при зимозан - индуцираното остро възпаление

Ранният етап (4th час) на възпалението, предизвикано от зимозан, е свързан с повишена продукция на хемокините MIP-1 α и RANTES в плазмата и в перитонеалния ексудат (Табл. 3). Тези фактори са отговорни за привличането на моноцити, Т клетки и неутрофили в тъканите. Във VIP тетрираната група нивата на MIP-1 α и RANTES също бяха повишени в сравнение с контролите, но са доста по - ниски в сравнение със ЗИ третираната група.

4.2.3.3. Ефекти на VIP върху нивата на възпалителните медиатори TNF- α , IL-10, IFN- γ , при зимозан-индуциран шок

Възпалението, предизвикано от зимозан (на 4th час след индукцията) е свързано със значително повишено ниво на цитокините TNF- α , IL-10, IFN- γ в плазмата и в перитонеалния ексудат (Табл. 4). За някои от тях (TNF- α в плазма) повишението е над 11 пъти в сравнение с контролите. Прилагането на VIP (VIP + ЗИ) значително намали нивата на TNF- α и повиши тези на IL-10. При анти-VIP претретиране, ефектът на VIP върху

нивата на TNF- α в перитонеум и на IL-10 в плазмата и перитонеума не се наблюдава. Нивата на IFN- γ в плазмата и в перитонеалния ексудат си оставаха високи (повече от 10 пъти) и при трите изследвани групи опитни животни (VIP, VIP + ЗИ, анти-VIP + VIP + ЗИ).

Таблица 3. Ефект на VIP върху нивото на хемокини в перитонеалния ексудат и плазма 4 часа след третиране със зимозан

Групи	RANTES (pg/ml)		MIP - 1 α (pg/ml)	
	Плазма	Перит. ексудат	Плазма	Перит. ексудат
Контроли	88 \pm 4	200 \pm 28	220 \pm 18	205 \pm 12
ЗИ	570 \pm 52	856 \pm 65	660 \pm 46	1000 \pm 25
ЗИ +VIP	460 \pm 38**	585 \pm 34***	300 \pm 20***	720 \pm 100***

Резултатите са представени като средно-аритметична стойност \pm SD от 3 повторения при 5 мишки в група и са анализирани със Student's *t* тест. **P* < 0.01, ****P* < 0.001 спрямо зимозан-инжектираната група.

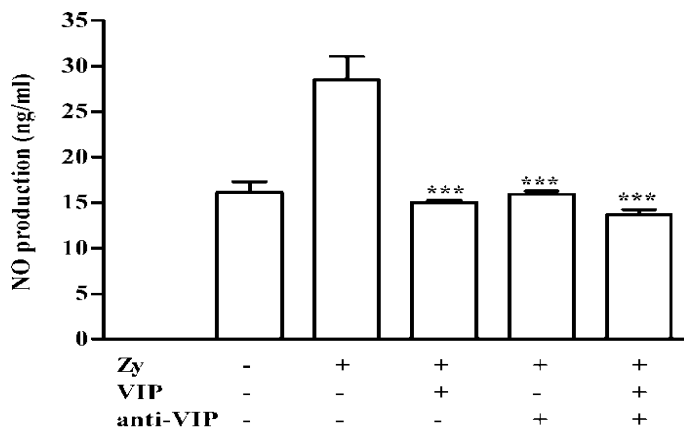
Таблица 4. Ефект на VIP върху нивото на цитокини в перитонеалния ексудат и плазма 4 часа след третиране със зимозан

Групи	TNF- α (pg/ml)		IL-10 (pg/ml)		IFN- γ (pg/ml)
	Плазма	Перит. ексудат	Плазма	Перит. ексудат	Плазма
Контроли	268 \pm 34	784 \pm 68	120 \pm 10	75 \pm 12	480 \pm 34
ЗИ	3077 \pm 132	4356 \pm 305	688 \pm 46	434 \pm 25	2455 \pm 280
ЗИ +VIP	1356 \pm 68**	1235 \pm 54**	1400 \pm 240**	1254 \pm 100**	4900 \pm 440**
Анти-VIP + ЗИ+ VIP	1947 \pm 148**	3625 \pm 284*	774 \pm 78	380 \pm 25	5548 \pm 438**

Резултатите са представени като средно-аритметична стойност \pm SD от 3 повторения при 5 мишки в група и са анализирани със Student's *t* тест. **P* < 0.01, ****P* < 0.001 спрямо зимозан-инжектираната група.

4.2.3.4. Ефекти на VIP върху активността на перитонеалните макрофаги

24 часа след инжектирането на зимозан, перитонеалните макрофаги са активни и спонтанно отделят NO. При повторна стимулация със зимозан продукцията на NO от макрофагите е увеличена. Наличието на VIP и анти-VIP в клетъчните култури по време на стимулацията, значително понижи синтезата на NO (Фиг. 10).



Фиг 10. Ефект на VIP върху продукцията на NO. Перитонеални макрофаги ($1 \times 10^6/\text{ml}$), изолирани 24ч. след инжектирането на зимозан, са култивирани *in vitro* в отсъствие на стимули (спонтанно освобождаване) и след повторна стимулация със зимозан ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) в присъствие на VIP ($1 \times 10^{-8} \text{M}$). При група от клетки, претретиран с анти – VIP ($1 \times 10^{-8} \text{M}$) за 30 мин., VIP и зимозан са добавяни след измиването. Меренето на NO става в супернатантата след 18 ч. *** $P < 0.001$ спрямо зимозан-третираната група.

4.2.3.5. Ефекти на VIP върху ранните поражения в органите при зимозан-индуцираното остро възпаление

24 часа след инжектирането на зимозан се отчита силно понижено време на коагулация (Табл. 5) и рязко покачване в нивата на $\alpha 1$ -антитрипсина в серум (Фиг. 19 А). Наблюдава се също така хипогликемия, повишени нива на креатинина, аланин-аминотрансферазата (АЛАТ), аспартат-аминотрансферазата (АСАТ) и билирубина, което е индикатор за началото на чернодробна и бъбречна дисфункция (Табл. 5). Прилагането на VIP (групата на VIP + ЗИ) не оказва влияние върху пониженото от зимозана време на коагулация, но допълнително повиши нивата на $\alpha 1$ -антитрипсина. Прилагането на VIP антагонист (групата анти-VIP + VIP + ЗИ) допълнително понижи намаленото от зимозана време на коагулация и редуцира ефекта на зимозан по отношение на $\alpha 1$ - антитрипсина

(Фиг. 11А). Резултатите корелират напълно с данните, получени от имуноблот анализа на пробите, взети от серум на нетретиранни, VIP или анти-VIP третирани мишки (Фиг. 11В). По отношение на биохимичните показатели в кръвта, третирането с VIP (групата VIP + ЗИ) в значителна степен нормализира техните нивата. Прилагането на VIP антагонист (групата анти-VIP + VIP + ЗИ) показва по-слаб ефект по отношение на всички показатели, в сравнение с VIP. Трябва да се отбележи и факта, че третирането с VIP и анти-VIP + VIP в отсъствие на зимозан (при здрави животни) също повишава нивата на АСАТ.

Таблица 5. Ефект на VIP върху времето на коагулация и плазмените концентрации на биохимични показатели в кръвта

Групи	Време на коагулация (min)	Глюкоза (mg/dl)	Креатинин (μM)	АЛАТ (U/l)	АСАТ (U/l)	Билирубин (μM)
Контроли	12.5±1.4	89.6±4.0	24.3±2.0	57.2±2.3	0.49±0.05	1.9±0.3
VIP	10.8±1.0	91.0±4.0	30.7±2.0	49.7±3.0	0.60±0.04**	2.0±0.2
Анти-VIP	10.6±1.5	102.9±5.5	32.8±1.6	44.8±5.2	0.69±0.06**	1.7±0.4
ЗИ	7.5±0.5***	31.3±2.5***	120.6±5.4***	114.8±6.2***	19.06±0.64**	16.6±0.6***
VIP+ЗИ	7.0±1.0***	58.3±1.0***###	57.5±2.5***###	69.8±3.5***###	10.06±0.05***###	2.7±0.7*###
Анти-VIP+ЗИ+VIP	5.3±0.5***#	63.0±2.5***###	73.4±4.6***##	92.3±3.9***	22.6±0.13***	9.8±0.5***###

* $P < 0.05$.

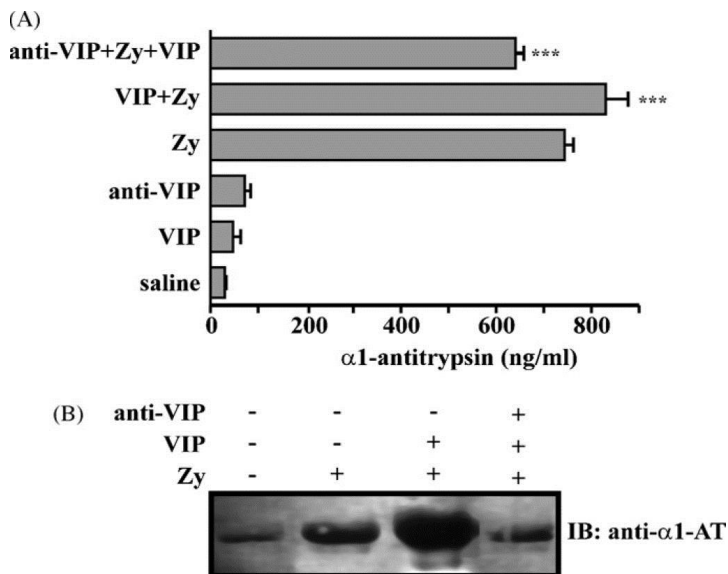
** $P < 0.01$.

*** $P < 0.001$ спрямо контролите

$P < 0.05$.

$P < 0.01$.

$P < 0.001$ спрямо ЗИ



Фиг. 11. Ефекти на VIP върху нивата на α 1-антитрипсина в серум. VIP (200 nmol / kg) бе прилаган интравенозно, едновременно със зимозан, или 30 мин. след анти – VIP (200 nmol / kg), въведен интраперитонеално. Нивата са определени чрез ELISA (A) и след SDS-PAGE електрофореза на проби от серум, последвано от имуноблот (B).

4.2.3.6 Ефекти на VIP върху теглото на органите в раните етапи на зимозан – индуцираното остро възпаление

24 часа след инжектирането на зимозан се наблюдава увеличение в размера на бъбреци, слезка, черен и бял дроб (Табл. 6). Третирането с VIP (групата на VIP + ЗИ) предотвратява органното нарастване. Използването на VIP антагонист (групата анти-VIP + VIP + ЗИ) неутрализира ефекта на VIP, като размерът на органите е идентичен с тези при зимозан-третираните мишки. Изключение правеше само черния дроб.

4.2.4. Ефекти на VIP върху развитието на полиорганна дисфункция в по-късните етапи на зимозан-индуцираното остро възпаление

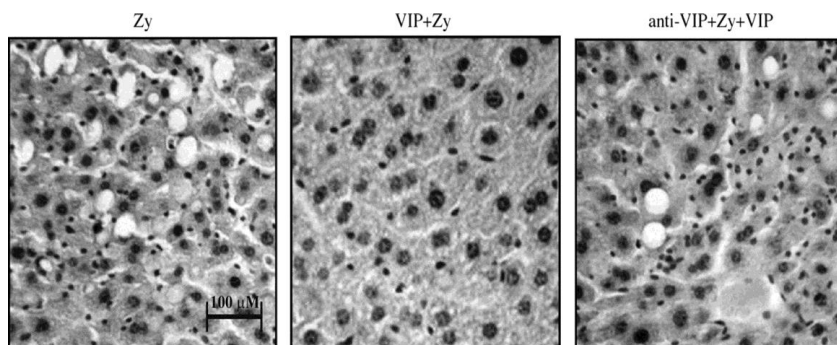
4.2.4.1. Ефект на VIP върху чернодробното увреждане в по-късните етапи на зимозан-индуцираното остро възпаление

На Фиг. 12 е представено хистопатологично изследване на черен дроб, проведено на 7^{ия} ден след инжектирането на токсина ЗИ. Ясно личи развитието на локален възпалителен процес при ЗИ и анти-VIP (анти-VIP + VIP + ЗИ) третираните мишки, характеризирещ се с клетъчна инфилтрация, липидни включения и тъканно увреждане. При VIP-третираната група възпалителният процес е по-слабо изразен.

Таблица 6. Относителното тегло на далак, черен дроб, бъбреци и бял дроб 24 ч след инжектирането на ЗИ.

Групи	Далак	Черен дроб	Бъбреци	Бял дроб
Контроли	0.47 ± 0.02	5.64 ± 0.37	0.78 ± 0.063	0.57 ± 0.01
VIP	0.46 ± 0.04	4.90 ± 0.30	0.71 ± 0.07	0.66 ± 0.16
Анти-VIP	0.52 ± 0.06	5.84 ± 0.25	0.74 ± 0.06	0.74 ± 0.02
ЗИ	0.69 ± 0.04	7.22 ± 0.62	0.94 ± 0.09	0.92 ± 0.04
VIP+ЗИ	0.46 ± 0.05*	6.26 ± 0.50*	0.81 ± 0.01*	0.80 ± 0.03*
Анти-VIP+ЗИ+VIP	0.72 ± 0.06	5.94 ± 0.39*	0.94 ± 0.03	0.95 ± 0.01

Резултатите са представени като (органно тегло/телесно тегло) x 100% в три независими изследвания е по 5 мишки в група. **P* < 0.05 спрямо ЗИ-третираните групи.



Фиг. 12. Изменения в черния дроб при мишки със зимозан-индуциран шок. На фигурата са представени предствителни срези от черен дроб при ЗИ, VIP + ЗИ и анти - VIP + ЗИ + VIP третираните мишки. Хистопатологичното изследване е проведено на 7 ден след инжектирането на ЗИ. Оцветяването е извършено с хематоксилин и еозин.

4.2.4.2. Ефекти на VIP върху теглото на слезката в по - късните етапи на зимозан - индуцираното остро възпаление

Степента на нарастване на слезката е измерена на 7^{ия} ден след инжектирането на зимозан. В групата на VIP (VIP + ЗИ) третираните животни размерът на слезката е както при здравите животни, докато при ЗИ и анти-VIP (анти-VIP + VIP + ЗИ) третираните животни се наблюдава голямо увеличение в размера на органа (Фиг. 13).



Фиг. 13. Ефект на VIP върху нарастването на слезката (7 дни след зимозан-индуцираното възпаление)

V. Обсъждане

При откриването си през 1970 година VIP е бил описан само като пептид, способен да предизвиква вазодилатация (Said and Mutt 1970; 1972). По-късно през годините е установено, че той е член на фамилията “мозъчно-чревни” пептиди и е широко разпространен както в неврони на централната (Baldino et al., 1989) така и на периферната нервна система (Schutzberg et al., 1980). ВИП участва в контрола на редица биологични процеси в организма (Fahrenkrug et al., 1988, Dickson and Finlayson 2009, Nowak et al., 1994, Mazzocchi et al., 1998; Winzell and Ahren 2007, Malhotra et al., 1988, Gonzalez-Rey and Delgado, 2007, Shinohara et al., 1994; Piggins and Cutler, 2003, Magistretti et al., 1998, Brennehan et al., 1997; Dejda et al., 2005; Schwartz, 1992; Sorg and Magistretti, 1992), което

логично е довело до нуждата от изясняване на неговата физиологична и патофизиологична значимост в организма.

Една от основните задачи в дисертационния труд беше да се разширят известните в литературата данни относно централните и периферни невромодулаторни ефекти на VIP.

За целта в група експерименти сме проследили ефекта на невропептида както върху неврогенно предизвиканите гладкомускулни съкращения с тяхната пуринаргична и адренергична компонента, така и върху миогенно-предизвиканите съкратителни отговори на вас деференс от морско свинче и плъх в опити *in vitro*. От редица автори е показано, че изолирани гладкомускулни препарати от вас деференс отговарят при полева електрическа стимулация с бифазен съкратителен отговор (Fedan et al., 1981; Snnedon and Westfall, 1984). Различават се една начална фазична компонента, опосредствана от ATP (Fedan et al., 1981; Snnedon and Westfall, 1984) последвана от една по-бавна, тонична компонента, медирана от NA (Swedin, 1971; Ambache and Zar, 1971; Amobi and Smith, 1987; Anton et al., 1977; McGrath, 1978; Allcorn et al., 1986; Sneddon et al., 1984). Ефекта на агонистите се реализира чрез директно взаимодействие с постсинапсно разположените α_1 и P_{2x1} адрено и пурино рецептори (Westfall et al., 1996; Mulryan et al., 2000).

В нашите експерименти гванетидин и TTX премахнаха напълно електрическите, но не и съкратителни отговори, получени при екзогенното въвеждане на агонистите ATP и NA. Тези данни показват, че при използваните параметри на електрическо дразнене съкратителните отговори на вас деференс са неврогенни. Установихме, че екзогенното въвеждане на VIP има потискащ ефект върху електрически-предизвиканите съкратителни отговора на вас деференс при плъх и морско свинче. Наблюдаваният от нас инхибиторен ефект съвпада с този, наблюдаван от Kastin и сътрудници (1978) при мишки. Едно възможно обяснение на този ефект е, че в присъствие на VIP се редуцира освобождаването на невротрансмитери от стимулираните с ПЕС адренергични неврони, което намалява амплитудата на съкратителния отговор. В литературата до сега няма данни за наличие на специфични пресинапсни VIP-ергични рецептори, което предполага, че ефектът на невропептида се реализира чрез повлияване на пресинапсно разположените α_2 и P_1/P_3 адрено- и пурино- рецептори. Демонстрирахме също видови различия в съкратителния отговор. При морско свинче, VIP понижи достоверно в по-голяма степен пуринаргичната (първата) в сравнение с адренергичната (втората) компонента на

съкратителния отговор. При плъх, VIP в почти еднаква степен потиска и двете компоненти на съкратителния отговор. Предполагаме, че различно изразената холинергична инервация на органа при двата вида животни е причина за различията в съкратителния отговор. По данни в литературата при плъх тя е по-слабо застъпена, като по-голямата част от наличните холинергични неврони контактуват директно с адренергичните неврони (Burnstock, 1970; Dixon and Gosling, 1972).

Резултатите, представени в настоящия труд показваха също наличие на директен миогенен ефект на VIP. Екзогенното въвеждане на неврпептида предизвиква слаб инхибиторен ефект върху АТР-предизвиканите и силно стимулиращо действие (повече от 80 %) по отношение на NA-предизвиканите съкращения. Изясняването на точния механизъм на действие на пептида изисква допълнителни изследвания.

В отделна група експерименти, с помощта на *in vivo* микродиализна техника, за пръв път бе проследен ефекта на екзогенно въведен VIP върху екстрацелуларните нива на АСh и DA в мозъчна кора и хипокамп на плъх. Получените резултати показват, че VIP е в състояние да модулира холинергичната и катехоламергичната невротрасмитерни системи в изследваните от нас мозъчни структури. В нашите експерименти той показва стимулиращ ефект върху освобождаването на АСh в мозъчна кора и хипокам, което е потвърждение на наблюденията от Masuo и сътрудници 1993 г. стимулиращ ефект на VIP върху освобождаването на АСh в хипокамп на плъх при използването на микродиализна техника. Ефекта на пептида върху освобождаването на DA в нашите експерименти е разнопосочен: в хипокамп той предизвиква увеличение на екстрацелуларните нива на катехоламините, в това число и на DA, докато в мозъчната кора намали отделянето на допамин. Според съобщени в литературата данни VIP-ергичните неврони в мозъчната кора и хипокамп при гризачи са интерневрони, всички покзват и GABA-имунореактивност (Bayraktar et al., 1997; Acsády et al., 1996; Hajos et al., 1996), а една голяма част от тях показват и колокализация с холинацетилтрансферазата (Bayraktar et al., 1997; Chedotal et al., 1994; Eckenstein and Vaughan, 1984). Това е анатомичния субстрат улесняващ комплексното взаимодействие между трите невротрансмитера - VIP, АСh и GABA (Bayraktar et al., 1997). Интерес представлява и факта, че в хипокампа разпределението на холинергичните рецептори се припокрива с това на VIP в нервните терминали (Freedman et al., 1993; Levey et al., 1995), което предполага възможността VIP и

ACh да взаимодействат върху GABA-ергичните терминали в тази мозъчна структура. На базата на получените от нас резултати и споменатите по-горе литературни данни ние допускаме, че в мозъчната кора ефектът на VIP върху освобождаването на ACh е директен, докато в хипокампа той може би е опосредстван от интерневрони. По отношение на DA предполагаме, че вероятно става въпрос за два различни механизма на действие на VIP в мозъчна кора и хипокампа.

На последния етап от експериментите в дисертационния труд беше изследван протективния ефект на VIP. Използвани бяха два експериментални модела в опитни животни - *in vivo* експериментални модели на Паркинсонова болест и на зимозан-предизвикано остро възпаление. Получените от нас оригинални резултати демонстрираха способността на VIP да намали нивото на оксидативния стрес в клетките на плъхове с експериментален модел на болестта на Паркинсон, редуцирайки нивата на липидна пероксидация. Както е известно БП е едно от най-разпространените невродегенеративни заболявания сред населението, което води до драстично влошаване качеството на живот. Най-засегнати са хора на възраст над 50 години. Етиологията на заболяването е неизвестна, а терапията неефективна. Според една от съвременните хипотези, окислението на липидите е критично за патогенезата при различни заболявания, в това число и БП. Реактивните форми на кислорода (хидроксилни радикали, водороден прекис и др) са в състояние директно да атакуват полиненаситените мастни киселини в клетъчните мембрани, което води до сериозно клетъчно и тъкано увреждане (Mylonas and Kouretas, 1999). Използваният от нас експериментален модел на Паркинсонова болест имитира тези процеси. В лабораторни условия за получаване на модела използвахме катехоламинергичния невротоксин 6-OHDA. Той има структурно сходство с допамина и норадреналина, показва висок афинитет към плазменомембранните транспортери за тях (DAT и NET) и се натрупва селективно в допаминергичните и норадренергичните неврони, увреждайки катехоламинергичната невротрасмисия на ниво централна и периферна нервна система. Имайки предвид начина му на действие се смята, че 6-OHDA унищожава катехоламинергичните структури чрез образуване на реактивни форми на кислорода и куйнони (Cohen, 1984). Установена е склонността на 6-OHDA за спонтанна оксидация, при което се образува водороден прекис и пара куйнон (Saner and Thoenen, 1971; Heikkila and Cohen 1971). Инхибирането на липидната пероксидация от VIP в

животински модели на Паркинсон, показано в нашите експерименти, би могло да предотврати увреждането на клетъчните мембрани и да запази жизнеността на клетките.

Изследването на протективните ефекти на VIP в нашата работа продължи и върху експериментален модел на остро системно възпаление. Възпалението е част от механизмите, чрез които вроденият имунитет реагира на въздействието на околната среда. То е обща проява при редица заболявания и патологични синдроми и е с висока социална значимост. Възпалителните реакции се характеризират основно с увеличена продукция на редица про-инфламаторни фактори като цитокини, хемокини и компоненти на комплемента, водещи до свръхактивиране или потискане на разнообразни клетъчни суб-популации. Във всички тези патологични процеси участват редица клетъчни рецептори и сигнални елементи, контролиращи в различна степен протичащите реакции на активация. Краен резултат от тази нарушена регулация и баланс в имунният отговор е тежкото увреждане на органи и тъкани, а в редица случаи и смърт (Janeway and Medzhitov, 2002; Aderem and Underhill 1999; Laskin and Pendino 1995). Все още се търсят нови подходи за селективно потискане на клетките, участващи във възпалителните процеси. VIP е една от молекулите, показваща силен противовъзпалителен капацитет, способна да регулира синтезата на редица фактори на възпалението *in vitro* и *in vivo*, което съвсем естествено поражда очакванията, че този невропептид има възможност да бъде ефективен в условията на нарушен имуноен толеранс в организма.

За оценка на протективния капацитет на VIP беше проследен неговия ефект върху някои от основните процеси, протичащи в хода на остро системно възпаление, индуцирано от зимозан. Този модел е описан за първи път от Goris и сътрудници (Goris et al., 1986) при мишки и е признат за най-добро копие на синдрома на полиорганната дисфункция при човек. Широко се използва за проучване механизмите на системно възпаление, съчетано с органна недостатъчност. Характеризира се със свръхпродукция на възпалителни цитокини, медиатори и обща промяна във функциите на различни органи, като най-засегнати са белия дроб, черния дроб, слезката и бъбреците, съчетано с много висока смъртност.

Нашите резултатите показаха, че прилагането на VIP значително повишава броя на преживелите животни при зимозан-индуцираното остро възпаление, потиска продукцията на провъзпалителни медиатори, ограничава чернодробните увреждания и развитието на

хипогликемия, понижава продукцията на NO от активираните макрофаги и оказва превантивен ефект по отношение на органното нарастване. Ранният етап на процеса (4-ти час) се характеризира с повишени нива на провъзпалителните хемокини и цитокини MIP-1 α , RANTES, TNF- α и IFN- γ . Хемокините играят ключова роля за миграцията и адхезията на инфилтриращите се клетки до мястото на възпаление. Намаляването на нивото на хемокините, наблюдавано при VIP-третираните мишки, може да допринесе за облекчаване на острата фаза на зимозан-индуцираното възпаление. Един от възможните механизми на действие на невропептида е инхибиране образуването на TNF α , един от най-мощните активатори на RANTES. Инхибирането на MIP-1 α при VIP-третираните мишки може да засегне трафика на макрофагите, докато инхибирането на RANTES може да забави диференциацията на T клетките. Установихме, че третирането с VIP допълнително подсилва зимозан-индуцираното повишение в нивата на IFN γ , като комбинираното приложение на анти-VIP + VIP не бе в състояние да неутрализира ефекта. Тези наши резултати показват, че VIP най-вероятно няма директен ефект по отношение продукцията на IFN γ в циркулацията.

По време на острата фаза на зимозан-индуцираното възпаление се наблюдава първична чернодробна дисфункция и много често - промяна в бъбречната функция като резултат от намаленото кръвно налягане и метаболитни нарушения. Установихме, че прилагането на VIP понижава нивата на АЛАТ, АСАТ и билирубин в кръвта. При третираните с VIP животни чернодробният метаболизъм се нормализира и се предотврати развитието на хипогликемия. Това облекчаване на чернодробната дисфункция в ранната фаза на възпалението намалява степента на органното увреждане на 7^{ия} ден, характеризиращо се с масивна левкоцитна инфилтрация и с некроза на чернодробния паренхим. Прилагането на VIP има превантивен ефект и по отношение на органното нарастване както в ранния, така и в по-късния етап на възпалението. Неутрализацията на екзогенния VIP чрез анти-VIP претретиране (въведени в еднаква концентрация) води до една по-висока смъртност и органна недостатъчност. Тези наши резултати показват, че използвания като антагонист VIP-фрагмент, ефективно блокира VIP-свързващите места.

По време на острата фаза (24^{ия} час) на зимозан-индуцираното остро възпаление беше наблюдавано скъсяване на времето за коагулация. Аномално високата степен на коагулация може би се дължи на намалена синтеза на протеин С или на неговото

функционално инхибиране от протеините на острата фаза $\alpha 1$ -антитрипсин and $\alpha 2$ -макроглобулин. Нашите резултати са в подкрепа на втората възможност. Ние наблюдавахме една невъзможност на VIP да повлияе иницирираната от зимозана прокоагулация, съчетено с повишаване нивата на $\alpha 1$ -антитрипсин в циркулацията.

Макрофагите играят централна роля при възпалителния процес и органната дисфункция. Когато са в състояние на хиперактивност, те отделят голям брой провъзпалителни медиатори като: NO, TNF- α , IL-1 и IL-6 (Laskin and Pendino, 1995). Нашите данни показваха, че 24 часа след интраперитонеалното въвеждане на зимозан, перитонеалните макрофаги са активирани и спонтанно отделят NO. Тяхната *ex-vivo* повторна стимулация със зимозан води до едно допълнително освобождаване на NO - ефект, който липсваше при VIP и анти-VIP третираните мишки. Най-вероятното обяснение за еднаквостта в ефектите на VIP, анти-VIP и тяхната комбинация е, че блокирането на VIP-рецепторите от техния лиганд предизвиква понижаване в секрецията на NO. Предотвратяване образуването на TNF α и NO от активираните макрофаги от страна на VIP е в състояние да намали тъканното и органното увреждане. Това потвърдихме по отношение на черния дроб, където в резултат от третирането с VIP клетъчната инфилтрация и масните включения бяха силно намалени.

VI. Изводи

1. VIP потиска и двете компоненти на електрически-предизвиканите съкратителни отговори на вас деференс от морско свинче и плъх. Ефектът е по-силно изразен върху първата в сравнение с втората компонента на отговора при морско свинче.
2. VIP проявява инхибиторен ефект върху амплитудата на АТР-предизвиканите съкратителни отговори на вас деференс от морско свинче.
3. Прилагането на VIP оказва стимулиращ ефект върху амплитудата на НА-предизвиканите съкратителни отговори на вас деференс от морско свинче и плъх.
4. Локалното въвеждане на VIP през микродиализна мембрана, имплантирана в мозъчна кора на плъх, повишава екстрацелуларните нива на ACh и редуцира тези на DA.

5. Локалното въвеждане на VIP през микродиализна мембрана, имплантирана в хипокамп на плъх, повишава екстрацелуларните нива на ACh, DA, NE и E.
6. Прилагането на VIP при плъхове с експериментален модел на болест на Паркинсон оказва потискащ ефект върху нивата на липидна пероксидация в мозъчна кора, хипокамп и стриатум.
7. Прилагането на VIP при мишки със зимозан-индуцираното остро възпаление с полиорганна дисфункция значително повишава преживяемостта на опитните животни, което корелира с инхибиторния ефект на невропептида върху нивата на възпалителните медиатори TNF- α , MIP-1 α , RANTES и NO в перитонеалната кухина и кръвта.
8. Прилагането на VIP в ранните етапи на зимозан-индуцираното остро възпаление с полиорганна дисфункция има превантивен ефект по отношение на органната хипертрофия, хипогликемията и увеличените нива на АЛАТ, АСАТ и билирубин в плазмата.

VII. Приноси на дисертационния труд

1. Установено е модулиращо действие на VIP както върху невrogenните, така също върху АТР- и NA- предизвиканите съкратителни отговори на вас деференс на морско свинче и плъх.
2. За първи път е показан стимулиращ ефект на VIP върху освобождаването на ACh от мозъчна кора на плъх.
3. За първи път е изследван ефекта на VIP при зимозан-индуцирано остро възпаление, като е установено протективно действие на невропептида.
4. За първи път е демонстрирано, че VIP понижава липидната пероксидация и активността на ензима глутатион редуктаза в експериментален модел на болестта на Паркинсон.

VIII. Приложения

8.1. Публикации във връзка с дисертационния труд

1. **LAZAROVA M., Rakovska A., Kalfin R.** Effect of vasoactive intestinal peptide on acetylcholine release from cortex and hippocampus: in vivo microdialysis study. *CR Acad Bulg Sci* 57(4): 83-86, 2004.
2. **LAZAROVA M., Kalfin R., Raichev P., Milenov K.** Effects of somatostatin and vasoactive intestinal peptide on the contractile activity of vas deferens. *Acta Morphol. Anthropol.* 11, 66-71, 2006.
3. **Ivanovska N., Kalfin R., LAZAROVA M., Dimitrova P.** Exogenous VIP limits zymosan-induced generalized inflammation (ZIGI) in mice. *Immunol. Lett.* 110: 126-132, 2007, **IF = 2.301**
4. **LAZAROVA M., Kalfin R., Mateeva P., Mateva L., Petrov S., Lozanov V.** In vivo modulation of catecholamines release from cortex and hippocampus by vasoactive intestinal peptide. *Acta Morphol. Anthropol.* 13, 50-53, 2008.
5. **Kalfin R., LAZAROVA M., Mateeva P., Yankova L., Belcheva S., Tashev R.** Vasoactive intestinal peptide and Parkinson's disease. *Bulg. Chem. Communications* 49(E): 165-168, 2017, **IF = 0.242**

8.2. Съобщения по темата на дисертационния труд

1. **LAZAROVA M., Rakovska A., Kalfin R., Giovannini M., Bianchi L., Corte L., Pepeu G.** Modulation of hippocampal acetylcholine and GABA release by neurotensin and vasoactive intestinal peptide in freely moving rats. *INMED Conference on Nature and Nurture in Brain Development*, La Ciotat, France, September 5-8, p. 25, 2002.
2. **LAZAROVA M., Kalfin R., Milenov K.** Effect of vasoactive intestinal peptide on electrically-induced contractions in guinea-pig and rat vas deferens. *Annual Scientific Session of the Sofia Section of the Bulgarian Physiological Society*, Sofia, Bulgaria, January 27-28, 2003.
3. **LAZAROVA M., Kalfin R., Dzambazova-Maximova E., Zafirova J., Leventieva E., Milenov K.** Effects of some neuropeptides (vasoactive intestinal peptide, somatostatin, neurotensin) on the contractile activity of vas deferens. *VIII Congress of the Bulgarian Society of Physiological Sciences*, Sofia, Bulgaria, June 20-21, 2003. In: *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.*, Vol. 27 (1): 19, 2003.
4. **Kalfin R., LAZAROVA M., Milenov K.** Peptidergic influence on contractile activity in guinea-pig vas deferens: effects of somatostatin and vasoactive intestinal peptide. *IV Bulgarian Peptide Symposium*, Dolna Banja, Bulgaria, September 19-21, p 19, 2005.

5. **LAZAROVA M., Kalfin R., Mateeva P., Mateva L., Petrov S., Lozanov V.** Effect of vasoactive intestinal peptide on catecholamine release in rat hippocampus: in vivo microdialysis study. *East-European Symposium "Central and Peripheral Synaptic Transmission"*, Varna, Bulgaria, October 5-9, 2005. In: *Auton. Autacoid Pharmacol*, Vol. 26(1), p. 65, 2006.
6. **LAZAROVA M., Kalfin R., Mateeva P., Mateva L., Petrov S., Lozanov V.** In vivo modulation of catecholamines release from cortex and hippocampus by vasoactive intestinal peptide. *IVth Koprivshitsa Morphological Days and VIth National Conference of Anthropology*, Koprivshitsa, Bulgaria, June 2-4, 2006.
7. **Kalfin R., LAZAROVA M., Alexandrova R.** Manganese and Parkinson's disease. *Workshop on Biological Activity of Metals and Metal Compounds*, Sofia, Bulgaria, November 2-3, p. 21, 2006.
8. **Kalfin R., Tsvetanova E., LAZAROVA M., Mateeva P., Kessiova M., Leventieva-Necheva E., Alexandrova A., Petrov L., Alexandrova R., Raychev P., Belcheva I., Kirkova M.** Antioxidant defence system in rat brain in Parkinson's disease model. *Scientific Conference "25 years Medical Faculty"*, Stara Zagora, Bulgaria, September 27-29, p. 9, 2007.
9. **LAZAROVA M., Kalfin R., Raichev P., Milenov K.** Modulation of EFS-, ATP- and NA- induced contractions of vas deferens by vasoactive intestinal peptide. *V Bulgarian Peptide Symposium*, Blagoevgrad, Bulgaria, May 28-30, p, 2008.
10. **Kalfin R., LAZAROVA M., Leventieva-Necheva E., Mateeva P., Raychev P., Yankova L., Belcheva S.** Experimental model of Parkinson's disease in rat. *IIIrd Koprivshitsa Morphological Days and VIIth National Conference of Anthropology*, Koprivshitsa, Bulgaria, May 30 – June 1, 2008.
11. **Kalfin R., Leventieva-Necheva E., LAZAROVA M., Alexandrova R., Belcheva S.** Rat experimental model of Parkinson's disease: Behavioral verification. *IVth Koprivshitsa Morphological Days and VIIIth National Conference of Anthropology with International Participation*, Koprivshitsa, Bulgaria, June 4-6, 2010.
12. **Kalfin R., LAZAROVA M., Belcheva I.** Experimental model of Parkinson's disease – protective role of vasoactive intestinal peptide. *Experimental Models and Methods in Biomedical Research*, Sofia, Bulgaria, May 27-29, 2013.
13. **Kalfin R., LAZAROVA M., Ivanovska N., Pessina F., Sgaragli S., Maulik N., Das D.** An overview on the protective role of vasoactive intestinal peptide – dedicated to the 10th anniversary. *The Tenth Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products*, Sofia, Bulgaria, November 17-19, 2015.
14. **LAZAROVA M., Kalfin R.** Neuromodulatory effects of vasoactive intestinal peptide. *Scientific meeting of Bulgarian Society of Physiological Sciences - Sofia Branch*, Sofia, Bulgaria, February 19, 2016.

15. **Kalfin R., LAZAROVA M., Mateeva P., Yankova L., Belcheva S., Tashev R.** Vasoactive intestinal peptide and Parkinson's disease. *7th Bulgarian Peptide Symposium*, Sofia, Bulgaria, June 10-12, 2016.
16. **Kalfin R., LAZAROVA M., Popatanasov A., Pajpanova T., Tancheva L.** Ameliorating effect of new neurotensin analogue and vasoactive intestinal peptide and Parkinson's disease model. *The 11th World Congress on Controversies in Neurology*, Athens, Greece, March 23-26, 2017.
17. **Kalfin R., LAZAROVA M., Pessina F., Tancheva L., Pajpanova T.** Neuroprotective effects of vasoactive intestinal peptide. *35th European Peptide Symposium*, Dublin, Ireland, August 26-31, 2018.

8.3. Участия в научни проекти по темата на дисертационния труд

Ръководител на проект с Фонд „Научни изследвания“, договор № МУ-Л-1502/05 на тема „Ефекти на вазоактивния интестинален пептид при модел на болестта на Паркинсон: ефекти върху допаминергичната невротрансмитерна система и върху антиоксидантната защитна система в стриатум“, 2005-2008 г.

8.4. Цитирания на статиите от дисертационния труд

Ivanovska N., Kalfin R., **LAZAROVA M., Dimitrova P.** Exogenous VIP limits zymosan-induced generalized inflammation (ZIGI) in mice. *Immunology Letters*, 110 (2), pp. 126-132, 2007.

Цитирана от:

- Mirshafiey, A. Novel promising therapeutic agents in multiple sclerosis. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 1(3), 218-224, 2007.
- Xianzhe, Wu. Through the purgation of outlet obstruction constipation related to gastrointestinal hormones in rats. *International Traditional Chinese Medicine*, 2008.
- Xianzhe, Wu. Narrowing of the rectum using some method to build outlet obstructive constipation in animal models. *Chinese Medical Network*, 2008.
- Xianzhe, Wu. Outlet obstruction constipation in rat – content of plasma motilin and vasoactive intestinal peptide. *Practical Chinese Clinical Medicine*, 2008.
- Rinaldi B., Cuzzocrea, S. Donniacuo, M., Capuano, A., Di Palma, D., Imperatore, F., Mazzon, E., Rossi, F. Hiperbaric oxygen therapy reduces the toll-like receptor signaling pathway in multiple organ failures. *Intensive Care Medicine* 37 (7), 1110-1119, 2011.

- Antonelli M., Bonten M., Chastre J., Citerio G., Conti G., Curtis J.R., De Backer D., Zhang H. Year in review in intensive care medicine 2011: Nephrology, epidemiology, nutrition and therapeutics, neurology, ethical and legal issues, experimentals. *Intensive Care Medicine* 38(2), 192-209, 2012.
- Souza, Cássio Ricardo de Medeiros. Efeito anti-inflamatório do extrato metanólico de *Caulerpa mexicana* em modelo murino de inflamação generalizada induzida por zimosan. 2016. 77f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil, 2016.
- Cui Li, Yuan-Yuan Liu, Gui-Qiu Zhao, Jing Lin, Cheng-Ye Che, Nan Jiang, Na Li, Jie Zhang, Kun He, and Xu-Dong Peng. Role of vasoactive intestinal peptide in *Aspergillus fumigatus*-infected cornea. *Int J Ophthalmol.*, 11(2): 183–188, 2018.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам благодарност на ръководството на Института по невробиология при БАН за предоставените ми условия и материална база за работа. Сърдечно благодаря на научната ми ръководителка проф. Рени Калфин и на доцент Любка Танчева, за всестранната помощ и подкрепа, както и на всички колеги, които допринесоха за осъществяването на този труд.

