

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ



А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
на ДИСЕРТАЦИЯ
за присъждане на образователна и научна степен
“ДОКТОР”

Наташа Маринова Иванова

МОДУЛАТОРНИ МЕХАНИЗМИ УЧАСТВАЩИ В
РЕГУЛАЦИЯТА НА ДЕНОНОЩНИТЕ РИТМИ ПРИ
КАИНАТЕН МОДЕЛ НА ТЕМПОРАЛНА ЕПИЛЕПСИЯ СЪС
СЪПЪТСТВАЩА ХИПЕРТОНИЯ

Научна специалност:

“ФАРМАКОЛОГИЯ (вкл. Фармакокинетика и химиотерапия)”

Научен ръководител:

Доц. д-р Яна Димитрова Чекаларова

СОФИЯ, 2017

С голяма признателност и огромни благодарности към моя научен ръководител
Доц. д-р Яна Димитрова Чекаларова, без която този труд не би бил възможен.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ



НАТАША МАРИНОВА ИВАНОВА

**МОДУЛАТОРНИ МЕХАНИЗМИ УЧАСТВАЩИ В
РЕГУЛАЦИЯТА НА ДЕНОНОЩНИТЕ РИТМИ ПРИ
КАИНАТЕН МОДЕЛ НА ТЕМПОРАЛНА ЕПИЛЕПСИЯ СЪС
СЪПЪТСТВАЩА ХИПЕРТОНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ на ДИСЕРТАЦИЯ
за присъждане на образователна и научна степен

“ДОКТОР”

Научна специалност:

“ФАРМАКОЛОГИЯ (вкл. Фармакокинетика и химиотерапия)”

Научен ръководител:

Доц. д-р Яна Димитрова Чекаларова

Рецензенти:

Проф. д-р Росица Замфирова, ИНБ, БАН, София

Доц. д-р Катерина Георгиева, МУ – Пловдив

София, 2017

Дисертационният труд е разработен в в Института по невробиология, БАН. Състои се от 146 стандартни страници, 35 фигури, 2 таблици и 4 фотомикроскопски снимки. Списъкът с цитирана литература включва 205 заглавия.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на апробация, състояла се в Института по невробиология, БАН на 30 юни 2017 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 20.10.2017 г. от 11:00 часа в заседателната зала на Института по невробиология при БАН, ул. “Акад. Г. Бончев”, бл. 23, ет. 2, на открито заседание 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, както и на уеб страницата на Института.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	4
ВЪВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1: СЪСТОЯНИЕ НА ПРОБЛЕМА.....	7
ГЛАВА 2: ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	7
ГЛАВА 3: МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	8
3.1. Експериментални животни.....	8
3.2. Експериментален дизайн.....	8
3.2.1. Експеримент 1 – Изследване ефектите на Анг II през хроничната фаза на ТЕ при плъхове порода Wistar.....	8
3.2.2. Експеримент 2 - Изследване ефектите на лосартан върху интензитета на гърчова активност при КА-индуциран епилептичен статус и развитие на оксидативния стрес при плъхове порода Wistar и SHR.....	9
3.2.3. Експеримент 3 - Изследване ефектите на лосартан през хроничната фаза на ТЕ при плъхове порода Wistar и SHR.....	10
3.3. Хирургична манипулация - имплантиране на миниосмотични помпи.....	10
3.4. Предизвикване на епилептичен статус чрез инжектиране на каинова киселина.....	11
3.5. Биохимични методи (отчитане на липидна пероксидация и активност на ензима супероксид дисмутаза).....	11
3.6. Денонощно видео наблюдение на спонтанните гърчово-пристъпни прояви....	11
3.7. Поведенчески тестове.....	11
3.7.1. Тест за изследване на двигателна активност - отворено поле (OF).....	11

3.7.2. Тест за изследване на състояние на безпокойство - повдигнат кръстосан лабиринт (EPM).....	12
3.7.3. Тест за отчитане на предпочитание към сладки разтвори - депресивен тип поведение (анхедония).....	12
3.7.4. Тест за изследване на хипокамп-зависима пространствена памет - радиален осемраменен лабиринт (RAM).....	12
3.8. Хистологичен метод за изследване на невродегенеративните промени в хипокамп	12
3.9. Имунохистохимичен метод за изследване експресията на AT1 рецептори в дорзален хипокамп.....	12
3.10. Статистически методи за обработка и анализ на резултатите.....	13
ГЛАВА 4: РЕЗУЛТАТИ.....	13
4.1. Ефекти на Анг II върху епилептиформена активност, поведенчески промени и невронална загуба през хроничната фаза на темпорална епилепсия при плъхове порода Wistar.....	13
4.1.1. Латентен период и честота на спонтанна гърчова активност.....	13
4.1.2. Влияние на Анг II върху поведенческите промени през хроничната фаза на епилепсията.....	14
4.1.2.1. Двигателна активност.....	14
4.1.2.2. Състояние на безпокойство.....	15
4.1.2.3. Влияние на Анг II върху коморбидната депресия.....	16
4.1.2.4. Влияние на Анг II върху хипокамп-зависима пространствена памет.....	17
4.1.3. Влияние на Анг II върху невронална загуба в лимбични структури.....	18

4.2. Ефекти на лосартан върху интензитета на гърчова активност при КА-индуциран епилептичен статус и развитие на оксидативен стрес при спонтанно хипертензивни SHR и нормотензивни Wistar плъхове.....	21
4.2.1. Индуциране на епилептичен статус.....	21
4.2.2. Ефекти на лосартан върху нивата на липидна пероксидация.....	22
4.2.3. Ефекти на лосартан върху активността на цитозолната супероксид дисмутаза (SOD Cu/Zn)	22
4.3. Ефекти на лосартан върху епилептиформена активност, поведенчески промени, невронална загуба и експресия на AT1 рецептори в хипокамп през хроничната фаза на темпорална епилепсия при спонтанно хипертензивни SHR и нормотензивни Wistar плъхове.....	23
4.3.1. Латентен период и честота на спонтанна гърчова активност.....	23
4.3.2. Влияние на лосартан върху поведенческите промени през хроничната фаза на епилепсията.....	26
4.3.2.1. Двигателна активност.....	26
4.3.2.2. Състояние на безпокойство.....	28
4.3.2.3. Влияние на лосартан върху коморбидна депресия.....	30
4.3.2.4. Влияние на лосартан върху хипокамп-зависима пространствена памет.....	32
4.3.3. Влияние на лосартан върху невронална загуба в лимбични структури.....	34
4.3.4. Влияние на лосартан върху промени в мозъчната експресия на AT1 рецепторите при SHR и Wistar плъхове.....	38
ГЛАВА5: ОБОБЩЕНО ОБСЪЖДАНЕ.....	41
ГЛАВА6: ИЗВОДИ.....	45
ГЛАВА 7: СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	46

ГЛАВА 8: ПРИЛОЖЕНИЯ.....	47
8.1. Публикации.....	47
8.2. Участия и научни съобщения по темата на дисертационния труд.....	47
SUMMARY (Резюме на английски език).....	50

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

АНГ II/III/IV	ангиотензин II/III/IV
AT1/AT2	ангиотензин II тип 1/2 рецептор
БАН	Българска Академия на Науките
ЕС	епилептичен статус
ИНБ	Институт по невробиология
КА	каинова киселина
РАС	ренин-ангиотензинова система
СМП	спонтанни моторни пристъпи
ТЕ	темпорална епилепсия
AMPA	α -амино-3-хидрокси-5-метилизоксасол-4-пропионоцетна киселина
NMDA	N-метил-D-аспартат
SHR	спонтанно хипертензивни плъхове

ВЪВЕДЕНИЕ

Епилепсията е едно от най-старите неврологични заболявания, познати на човечеството и е най-често срещаното невродегенеративно заболяване след инсулт. Тя е *мултифакторно заболяване* с трайно предразположение на мозъка към повтарящи се спонтанни пристъпи със съпътстващи невробиологични, когнитивни, психологически и социални последици (Fisher et al., 2005, 2014) и с различна етиология, патогенеза, клиника и лечение. Епилепсията засяга 1% от населението на Земята, като съществуват повече от 300 вида епилепсии. Темпоралната епилепсия (ТЕ) е най-често срещаната симптоматична форма на фармакорезистентна епилепсия (Engel, 2001; Litt et al., 2001; McKeown and McNamara, 2001). В популация от нови пациенти с епилепсия, над 30% от тях имат пристъпи, произхождащи от слепоочния дял на мозъка (Manford et al., 1992). Лицата, засегнати от ТЕ обикновено имат сходна клинична картина, включваща първоначална внезапна травма (преципитиращо събитие) под формата на епилептичен статус (ЕС), травма на главата, енцефалит или фебрилни гърчове през детството (Harvey et al., 1997; Fisher et al., 1998; Cendes, 2004). Обикновено след определен латентен период, продължаващ от седмица до няколко години, се появяват спонтанни моторни пристъпи с огнища, произлизащи от слепоочния дял, които не затихват във времето и характеризират хроничната фаза на ТЕ, продължаваща до края на живота (Devinsky, 2004; Detour et al., 2005). Освен това, ТЕ се характеризира с хипокампадна склероза и значителна невродегенерация в хилуса на гирус дентатус, на СА1 и СА3с полета на хипокамп (Sloviter, 2005).

В последните няколко години, благодарение на широко използваните модели на експериментални животни, чрез които се изследва ефикасността на нови антиепилептични лекарства и се проучват невропротективни стратегии за превенции, е осъществено по-задълбочено вникване в патофизиологията на епилепсията (Löscher, 1998; Georgiev, 1999). Невротоксинът каинова киселина, изолиран от японско водорасло, е аналог на глутамата, който активирайки мозъчните каинатни, NMDA- и AMPA- рецептори осъществява своя епилептогенен ефект, предизвиквайки селективно увреждане и невронална смърт при гризачи. Най-често се прилага системно (интравенозно или интраперитонеално) въвеждане, което предизвиква епилептичен статус, продължаващ няколко часа с последваща епилептогенеза.

Мозъчната ренин-ангиотензинова система (РАС) участва в контрола на множество физиологични и поведенчески функции, включително регулиране на артериалното

налягане, освобождаване на хормони от хипофизната жлеза, поддържане на водно-солевия баланс, реакции на стрес, когнитивни процеси и депресия (Wright et al., 2008). Повечето от тези функции са медираны от ангиотензин II (Анг II) тип 1 (AT1) рецептори (de Gasparo, 2000). Освен добре известните класически физиологични функции, данните от литературата предполагат, че AT1 рецепторен подтип участва в модулирането на мозъчната възбудимост, продължителното потенциране и контрол на пристъпната чувствителност (Tchekalarova and Georgiev, 2005, 2006; Łukawski et al., 2010)

Спонтанно хипертензивните плъхове, като модел за изследване на връзката между хипертонията и патофизиологията на епилепсията, се отличават с хиперактивирана РАС, характеризираща се с ендотелна дисфункция, повишено артериално налягане и повишени маркери на клетъчен оксидативен стрес, който лежи в основата на патогенезата на много невродегенеративни, сърдечно-съдови и други заболявания, включително ЕС (Ashrafi et al., 2007, González et al., 2014). AT1 рецептор-медираните отговори на Анг II включват повишено освобождаване на маркери на възпалителните реакции като левкотриени, свободни радикали, С-реактивен протеин и простагландини (Das UN, 2005; Ashrafi et al., 2007, González et al., 2014), които са предпоставка за образуване на епилептигенно огнище.

Участието на AT1 рецепторите в ТЕ се подкрепя от резултатите на няколко лаборатории, показали, че те претърпяват пластични промени в хипокамп както при експериментални модели на епилепсия (Pereira et al., 2010; Gouveia et al., 2012), така и при пациенти с това заболяване (Argañaraz et al., 2008).

Приведените резултати в настоящия труд разширяват знанията относно ролята на РАС върху развитието на епилептогенезата и съпътстващите я усложнения. Изследвани са влиянието на продължително третиране с Анг II и антихипертензивния препарат лосартан, съответно, върху честотата на спонтанни моторни пристъпи, поведенчески промени, невронална загуба и експресия на AT1 рецептори при каинатен модел на темпорална епилепсия с коморбидна хипертония. Ефектите на AT1 рецепторния антагонист лосартан, въведен чрез субхронична инфузия, преди прилагане на невротоксина каинова киселина, са проучени с цел да бъде изяснено участието на AT1 рецепторите в развитието на епилептичен статус и последващия оксидативен стрес при модел на есенциална хипертония.

ГЛАВА 1: СЪСТОЯНИЕ НА ПРОБЛЕМА

Епилепсията се асоциира не само със симптоматика, характеризираща се със спонтанна епилептиформна активност, но и с по-голяма честота на коморбидните усложнения свързани с разстройства на познавателните функции, депресия и афективни състояния, аутизъм, синдром на дефицит на вниманието и хиперактивност. Ефикасността на прилаганите в съвременната практика антиконвулсанти, включително и тези от новото поколение, се определя основно от потискане на симптоматиката, но не и за предотвратяване хроничната фаза на епилепсията, както и съпътстващите неврохимични, морфологични и поведенчески нарушения свързани с развитието на оксидативен стрес, нарушено равновесие между възбудната и инхибиторна невромедиаторни системи, активирана невроглия и невронална загуба, когнитивни нарушения, депресия и емоционални разстройства. Съществува неотложна необходимост от разработване на алтернативни терапевтични подходи, които предотвратяват развитието на епилептогенно огнище, имат невропротективно действие и облекчават поведенческите нарушения.

През последните години се забелязва голям интерес към ренин ангиотензиновата система относно нейното участие в гърчово пристъпния феномен и се натрупа редица изследвания, включително и на нашия екип. Все още обаче липсват достатъчно данни относно нейната ролята и продължителното AT1 рецепторно блокиране при експериментални модели на епилепсия, включително при модел на коморбидна хипертония и епилепсия. Затова, настоящото проучване цели изясняване влиянието на продължително третиране с Анг II и антихипертензивния препарат лосартан върху честотата на спонтанни моторни пристъпи, оксидативен стрес, поведенчески промени, невронална загуба и експресия на AT1 рецептори при каинатен модел на темпорална епилепсия с коморбидна хипертония.

ГЛАВА 2: ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия труд: да бъде изследвана ролята на Анг II и участието на AT1 рецепторите върху развитието на епилептичен статус, честота на спонтанна епилептиформна активност, поведенческите, биохимични, хистологични и имунохистохимични промени при каинатен модел на темпорална епилепсия у спонтанно хипертензивни (SHR) и Wistar плъхове.

За изпълнението на целта са поставени следните основни задачи:

- Проучване ефектите на Анг II и ролята на AT1 рецепторите върху честота на спонтанна епилептиформна активност
- Проучване ефектите на Анг II и ролята на AT1 рецепторите върху нарушенията в поведенческите реакции през хроничната фаза на епилепсията
- Проучване ефектите на Анг II и ролята на AT1 рецепторите върху невроналната загуба в хипокамп през хроничната фаза на епилепсията
- Проучване участието на AT1 рецепторите върху развитието на оксидативен стрес при каинат-индуциран епилептичен статус
- Проучване промени в експресия на AT1 рецепторите в лимбични структури при модел на коморбидна хипертония и епилепсия

ГЛАВА 3: МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ



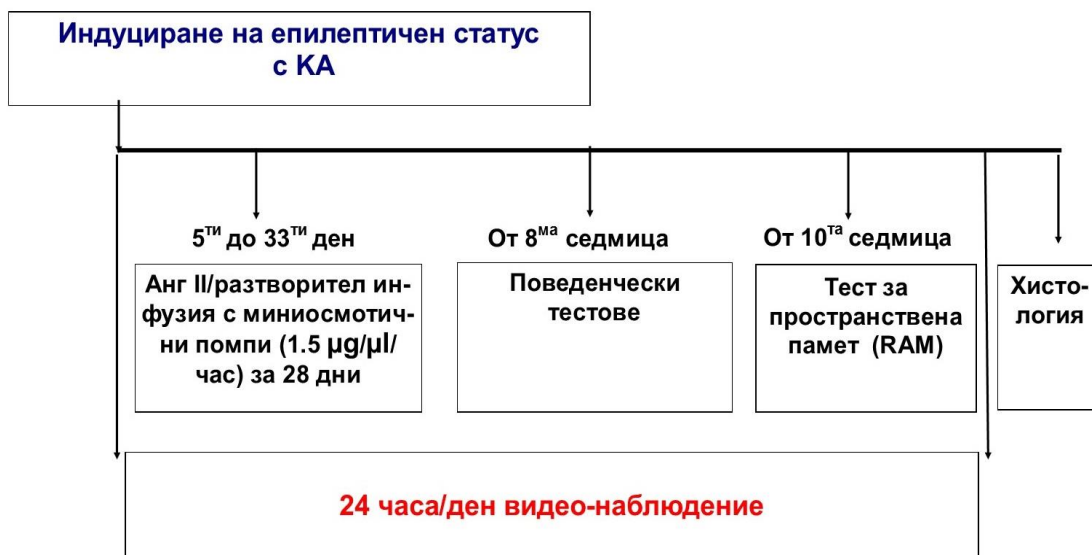
3.1. Експериментални животни

За всички експерименти се използват млади зрели мъжки плъхове от две породи - Wistar и спонтанно хипертензивни плъхове (SHR), с тегло между 200 - 300 g. Експерименталните процедури започват (есенно-зимния сезон) след адаптация от 7 дни в помещенията за отглеждане на животни към Институт по невробиология (ИНБ), Българска Академия на Науките (БАН) при стандартизирани условия (12/12-часов цикъл светло-тъмно, с начало на светлата фаза 08:00 ч., температура на въздуха $20-22\pm 2-3$ °C при относителна влажност 40-50%), със свободен достъп до храна и вода, с изключение на времето, в което се провеждат експериментите.

Изследванията се провеждат съгласно нормативната уредба за работа с експериментални животни в България и правилата на Етичната комисия към ИБН, БАН (регистрация FWA 00003059 US Department of Health and Human Services).

3.2. Експериментален дизайн

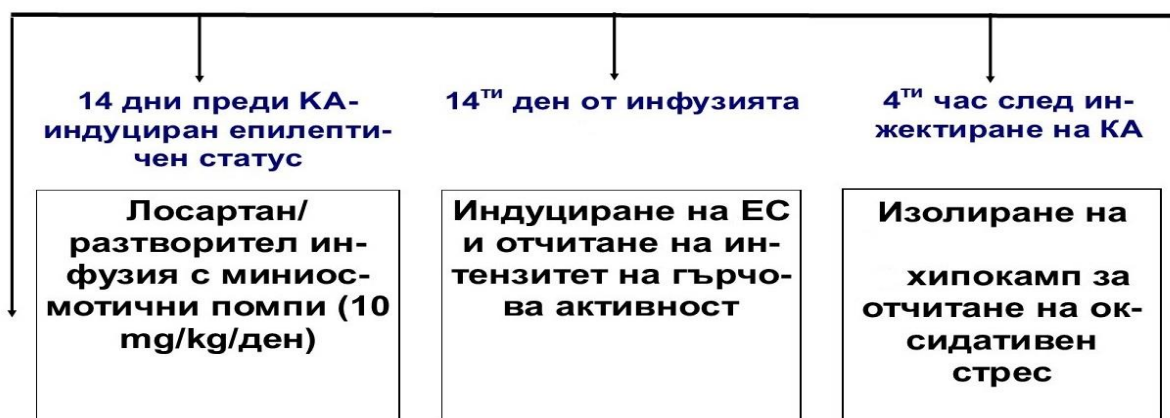
3.2.1. Експеримент 1 – Изследване ефектите на Анг II през хроничната фаза на ТЕ при плъхове порода Wistar



Фиг. 1 Експериментална схема на експеримент 1

Животните се разпределят на случаен принцип в четири експериментални групи, както следва: К-шам (n=10) - шам група, третирана с разтворител; К-Анг II (n=10) - контролна група, третирана с Анг II; КА-шам (n=14) – шам епилептична група, третирана с разтворител; КА-Анг II (n=14) - епилептична група, третирана с Анг II.

3.2.2. Експеримент 2 - Изследване ефектите на лосартан върху интензитета на гърчова активност при КА-индуциран епилептичен статус и развитие на оксидативен стрес при плъхове порода Wistar и SHR



Фиг. 2 Експериментална схема на експеримент 2

Животните се разпределят на случаен принцип в осем експериментални групи (n=10) - порода Wistar/SHR: група I: Wis-K-рл/SHR-K-рл - шам нормотензивна група, третирана с разтворител; група II: Wis-K-лос/SHR-K-лос – нормотензивна група,

третирана с лосартан; група III: Wis-КА-рл/SHR-КА-рл – шам нормотензивна група, третирана с КА+разтворител; група IV: Wis-КА-лос/SHR-КА-лос - нормотензивна група, третирана с КА+лосартан. Отчита се латентен период (минути) за поява на клонични пристъпи от клас III-V и интензитет на гърчова активност (скала на Racine, 1972).

3.2.3. Експеримент 3 - Изследване ефектите на лосартан през хроничната фаза на ТЕ при плъхове порода Wistar и SHR



Фиг. 3 Експериментална схема на експеримент 3

Животните се разпределят на случаен принцип - по четири експериментални групи, както следва, съответно за порода Wistar/SHR: Wis-K-рл/SHR-K-рл (n=10) - контролна група с разтворител; Wis-K-лос/SHR-K-лос (n=10) - контролна група, третирана с лосартан; Wis-КА-рл/SHR-КА-рл (n=13-15) – епилептична група; Wis-КА-лос/SHR-КА-лос (n=12-15) - епилептична група, третирана с лосартан.

3.3. Хирургична манипулация - имплантиране на миниосмотични помпи

Експеримент 1: Прави се разрез на кожата над черепа и надкостницата се отстранява. Долният край на канюла от неръждаема стомана (Alzet Brain Infusion Kit 2, Durect, Cupertino, CA) се имплантира в десния латерален церебрален вентрикул, а горният край е свързан към осмотична помпа за интрацеребровентрикуларна инфузия (модел Alzet 2004, 0.23 ± 0.02 $\mu\text{l}/\text{час}$). Помпата се поставя подкожно на гърба на плъха.

Експеримент 2: Прави се срез на скапулата, отваря се подкожен джоб, в който се имплантира миниосмотична помпа за подкожна инфузия (модел Alzet 2002, 0.5 $\mu\text{l}/\text{час}$).

3.4. Предиизвикване на епилептичен статус чрез инжектиране на каинова киселина

Епилептичният статус се предиизвиква, чрез интраперитонеално инжектиране на каинова киселина (Ascent Scientific, Великобритания) с неефективна доза от 2.5-5 mg/kg (Експеримент 1 и 3) на всеки един час, съгласно протокола на Hellier et al. (1998), при максимална допустима доза до 30 mg/kg/плъх или в еднократна доза от 12 mg/kg (Експеримент 2), съгласно протокол от предишни изследвания (Lopez-Meraz et al., 2005; Morales-Garcia et al., 2009).

3.5. Биохимични методи

Изолира се хипокамп и се отчита активност на ензима цитозолна супероксид дисмутаза (U/ml) и степента на липидна пероксидация (количествено в nmol), чрез използване на китове за анализ (Cayman Chemical Company, САЩ).

3.6. Денонощно видео наблюдение на спонтанните гърчово-пристъпни прояви

Извършва се видео-наблюдението (24 часа/ден, 24 часа след ЕС) с помощта на инфрачервена цветна камера (S-2016, AVTECH, Taiwan, no. AVC307R), свързана към компютър със специализирана програма за видео-обработка. Отчитат се следните параметри: а) латентен период (брой дни) до поява на първи спонтанен пристъп след ЕС и б) честота на гърчовата активност (брой пристъпи/месец от клас III, IV или V, скала на Racine 1972) за период от 3 месеца.

3.7. Поведенчески тестове

Тестовите отворено поле, повдигнат кръстосан лабиринт и тестът за принудително плуване се извършват в 15:00 ч. и в 03:00 ч. (светла и тъмна фази), а тестът за отчитане на предпочитание към сладки разтвори – в 08:00-20:00 ч. и в 20:00-08:00 ч. (светла и тъмна фази). Десет дни след последния опит, животните се тестват на радиален осем-раменен лабиринт. Наблюдението, обработката и анализа на експерименталните данни се осъществява чрез специализирана видео-проследяваща система (SMART PanLab software, Harvard Apparatus, САЩ), свързана с инфрачервена-чувствителна CCD камера.

3.7.1. Тест за изследване на двигателна активност - отворено поле (OF)

Чрез апарат OF (сива кутия от полистирен - 100x100x60 см, от общо 25 еднакви квадрата) се отчита обща траектория в (см).

3.7.2. Тест за изследване на състояние на безпокойство - повдигнат кръстосан лабиринт (EPM)

Чрез апарат EPM (от черно дърво, състои се от две отворени (50x10 см), две затворени рамена (50x10x50 см) и централна платформа (10x10 см) се отчита съотношение на време престой в отворените рамена (sec) спрямо общото време на експеримента (%).

3.7.3. Тест за отчитане на предпочитание към сладки разтвори - депресивен тип поведение (анхедония)

Тестът се провежда съгласно протокола на Willner (1987), като афинитетът към захарния разтвор се отчита като процент от обема на приетия захарен разтвор към общия обем на приетата течност за период от 12 часа (за светла фаза от 08:00-20:00 ч. и за тъмна фаза- 20:00-08:00 ч.).

3.7.5. Тест за изследване на хипокамп-зависима пространствена памет - радиален осем-раменен лабиринт (RAM)

Пространствената памет се изследва с тест с положително подкрепление (RAM) (Harvard Biosci. Comp., САЩ) за 18 дни, чрез апарат от неръждаема стомана, състоящ се от 8 еднакви рамена (42x12x12). Отчита се грешка на оперативната памет - повторното влизане в маркирано рамо.

3.8. Хистологичен метод за изследване на невродегенеративните промени в хипокамп

Приготвят се срези, с помощта на Reichert Jung замразяващ микротом с дебелина 5 µm, които се поставят върху хром-желатинирани предметни стъкла и се оцветяват с еозин и хематоксилин. Отчита се невронална загуба в септо-темпорална и темпорална част на CA1, CA2, CA3 полета на дорзален хипокамп.

3.9. Имунохистохимичен метод за изследване експресията на AT1 рецептори в дорзален хипокамп

Мозъчни срезове (с дебелина 6 µm) се поставят върху хром желатинирани предметни стъкла и се обработват за имунохистохимия с ABC (авидин-биотин-пероксидазен комплекс от хрян). За изследване експресия на AT1 рецептори в CA1, и

САЗ полета на дорзален хипокамп се прилага първично заешко поликлонално антитяло и свинско вторично антитяло. За анализ на имунореактивността на АТ1 рецепторите в пирамидните неврони на хипокамп е използван интензитет на сива скала (диапазон 0–255: черно = 0, бяло = 255). За имунопозитивни на АТ1 рецептори се считат неврони с интензитет >0.

Материалите в т. 3.8 и т. 3.9. се изследват, чрез светлинен микроскоп Nikon Eclipse 80i (Япония) и фотографират с цифров фотоапарат (Nikon DMX 1200).

3.10. Статистически методи за обработка и анализ на резултатите

Използван е специализиран софтуеър SigmaStat 11.0, като за всеки показател при всяка група са представени средната аритметична стойност и стандартната ѝ грешка ($\text{mean} \pm \text{SEM}$). В зависимост от разпределението на данните, резултатите се обработват с параметрични (при нормално разпределение на данните: Shapiro-Wilk и t-тест) или непараметрични (при неправилно разпределение на данните: Kruskal–Wallis и Mann-Whitney U-тест) тестове. Статистическата обработка включва еднофакторен, двуфакторен или трифакторен дисперсионен анализ ANOVA. Всички стойности с $p < 0.05$ се считат за статистически достоверни.

ГЛАВА 4: РЕЗУЛТАТИ

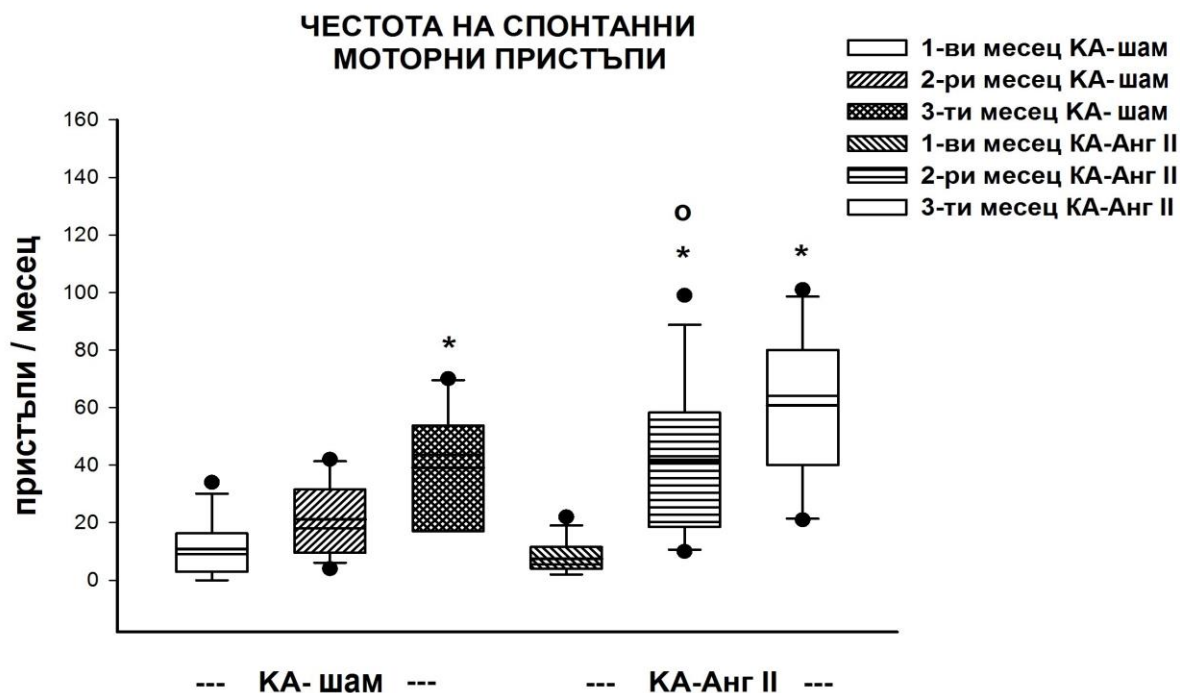
4.1. Ефекти на Анг II върху епилептиформена активност, поведенчески промени и невронална загуба през хроничната фаза на темпорална епилепсия при плъхове порода Wistar

4.1.1. Латентен период и честота на спонтанна гърчова активност

Продължителната интрацеребровентрикуларна инфузия на Анг II след ЕС значително намалява латентния период до поява на първия спонтанен моторен пристъп (СМП) (медиана: 7 дни, диапазон: 6-25 дни) в сравнение с този на третираната с разтворител шам група (КА-шам) (медиана: 15 дни, диапазон: 6-38 дни) (Mann-Whitney U-тест: $p=0.031$).

Еднофакторният дисперсионен анализ ANOVA показва влияние на фактора Време: ($N=19.409$, $p < 0.001$) върху честотата на СМП. Прогресия в честотата на СМП, като функция на времето е установена и при двете групи с епилепсия: КА-шам

($^{\circ}p < 0.05$, 3-ти спрямо 1-ви месец) и КА-Анг II ($^{\circ}p < 0.05$, 2-ри и 3-ти спрямо 1-ви месец, съответно) (Фиг. 4). Групата с инфузия на Анг II показва по-висока честота на СМП в сравнение с тази с разтворител през втория месец след ЕС ($*p < 0.05$).



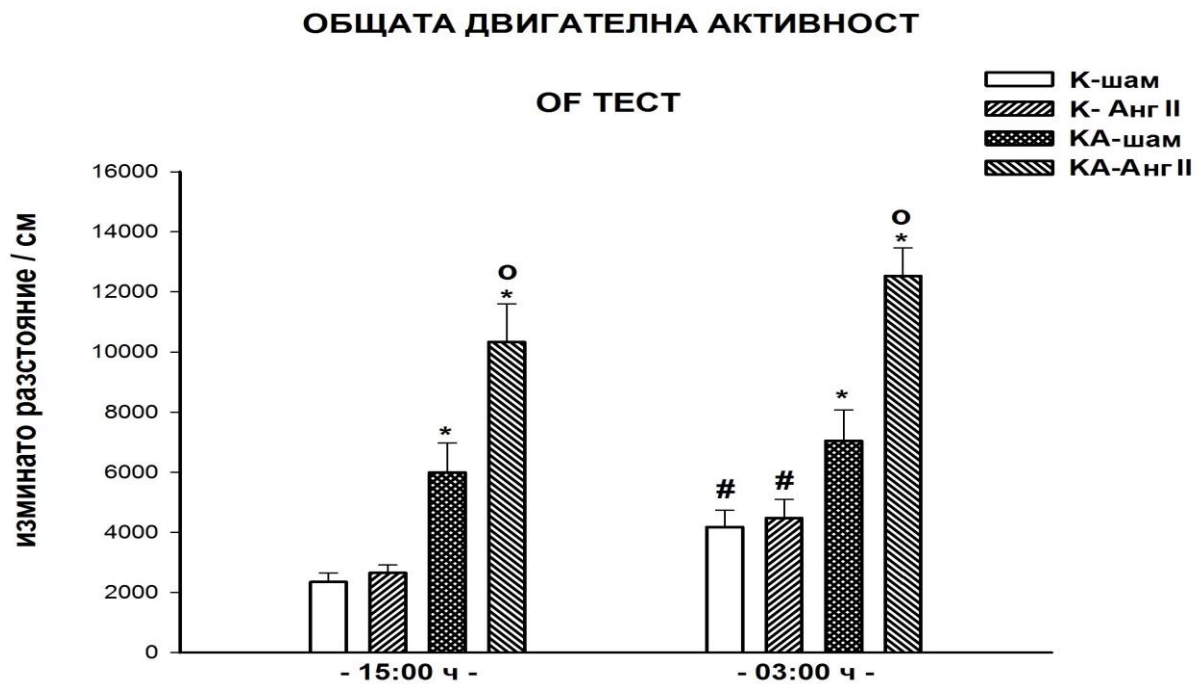
Фиг. 4 Ефекти на Анг II върху честотата на спонтанни моторни пристъпи през 1-ви, 2-ри и 3-ти месец след КА-индуциран епилептичен статус (24 часа видео наблюдение). Данните представят брой пристъпи на месец на КА-шам и КА-Анг II групите. Инфузията с Анг II/разтворител (интрацеребровентрикуларно) започва 5 дни след ЕС за 28-дневен период. $*p < 0.05$ вътре в групата; $^{\circ}p < 0.05$ между групите (спрямо КА-шам).

4.1.2. Влияние на Анг II върху поведенческите промени през хроничната фаза на епилепсията

4.1.2.1. Двигателна активност

Трифакторният дисперсионен анализ ANOVA показва влияние на трите фактора: Фаза: [$F_{1,132}=8.60$, $p < 0.004$], Епилепсия: [$F_{1,132}=89.45$, $p < 0.001$] и Анг II: [$F_{1,132}=19.66$, $p < 0.001$], както и взаимодействие между факторите Епилепсия и Анг II: [$F_{1,132}=15.33$, $p < 0.05$] върху общата двигателна активност при OF тест. Пост-хок анализът показва, че групите без епилепсия (К-шам и К-Анг II) се характеризират с по-голямо изминато разстояние през тъмната фаза в сравнение със светлата ($^{\#}p < 0.05$) (Фиг.

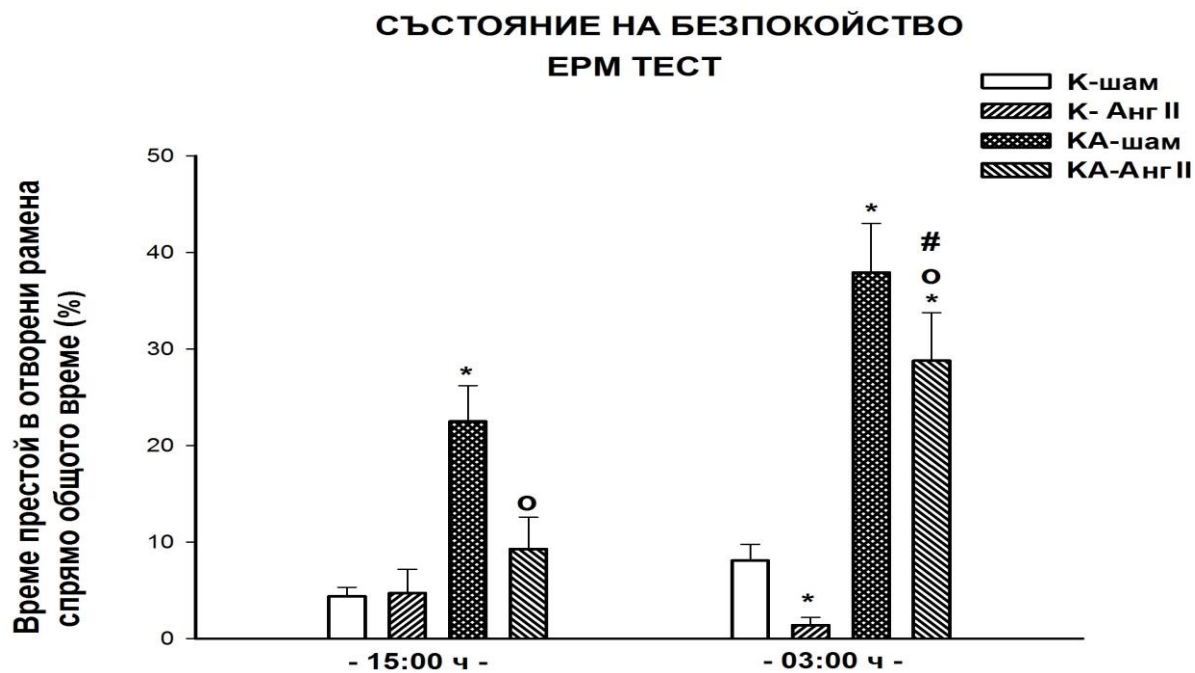
5), докато Анг II потенцира КА-индуцираната повишена локомоция и през двете фази на денонощието (*^op<0.05).



Фиг. 5 Ефекти на Анг II върху денонощни вариации на общата двигателна активност, измерена с изминато разстояние в см при OF тест. Данните са представени като mean ± S.E.M. *p<0.05 спрямо К-шам; °p <0.05 спрямо КА-шам; #p<0.05 вътре в групата.

4.1.2.2. Състояние на безпокойство

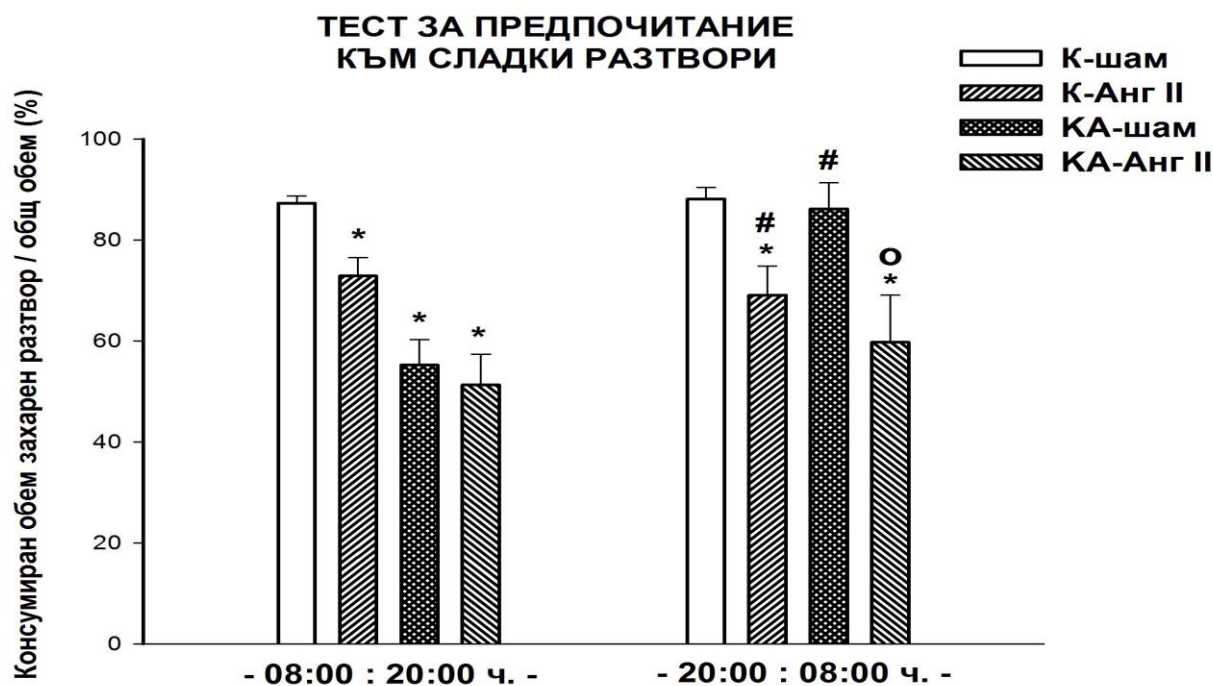
При ЕРМ теста, трифакторният ANOVA показва влияние на трите фактора Фаза: [F_{1.87}=12.83, p<0.001], Епилепсия: [F_{1.87}=63.98, p<0.001] и Анг II: [F_{1.89}=14.16, p<0.001], а също и Фаза x Епилепсия x Анг II взаимодействие: [F_{1.72}=14.55, p<0.001] за съотношението на време престой в отворените рамена спрямо общото време на теста. Пост-хок анализът потвърждава импулсивния тип поведение, характерен за КА-третираните плъхове и през двете фази на денонощния цикъл (*p<0.05) (Фиг. 6). Анг II инфузиран на контролните животни оказва анксиогенен ефект през тъмната фаза (*p<0.05), но при епилептичната група оказва облекчаващ ефект върху патологично намаленото ниво на безпокойство (°p<0.05) и през двете фази на денонощния цикъл.



Фиг. 6 Ефекти на Анг II върху денонощни вариации на състояние на безпокойство, измерено с време престой в отворени рамена спрямо общото време (%). Данните са представени като mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ спрямо К-шам; ^o $p < 0.05$ спрямо КА-шам; [#] $p < 0.05$ вътре в групата.

4.1.2.3. Влияние на Анг II върху коморбидната депресия

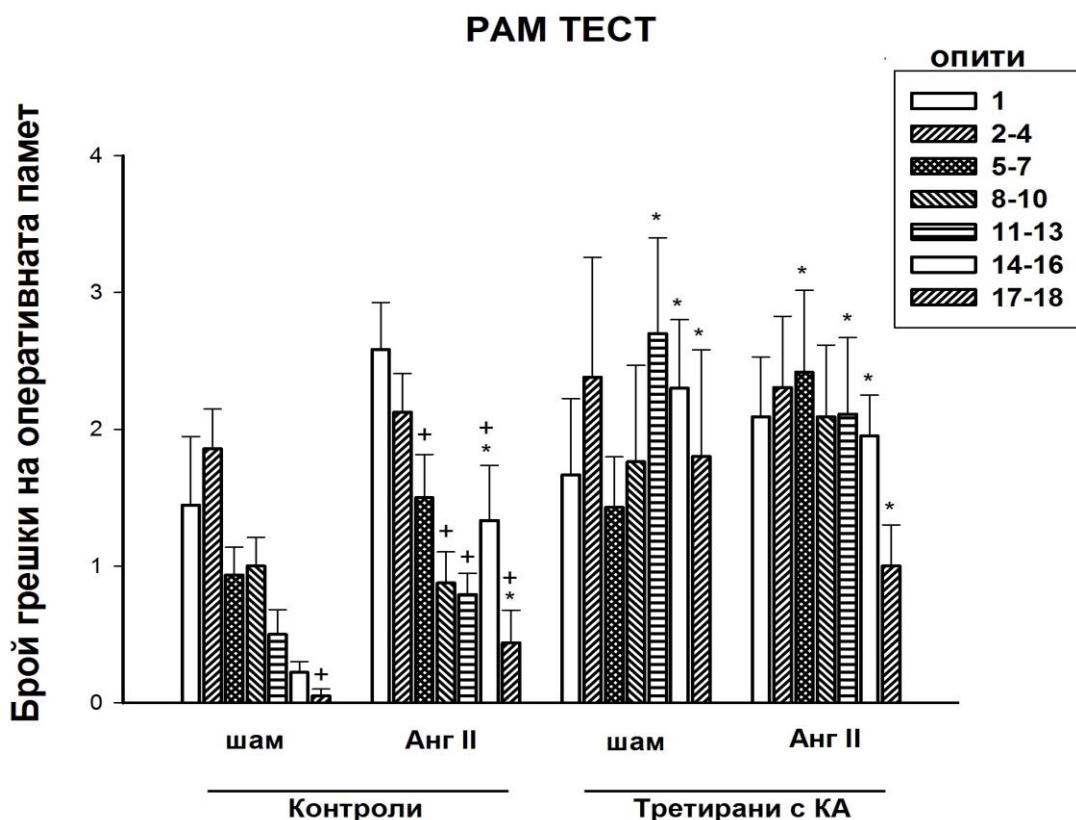
Трифакторният ANOVA анализ показва влияние на факторите Епилепсия: [$F_{1,109} = 13.82$, $p < 0.001$] и Анг II: [$F_{1,109} = 16.46$, $p < 0.007$], с установено взаимодействие на факторите Фаза и Епилепсия: [$F_{1,109} = 5.12$, $p < 0.026$] върху теста за предпочитанието към сладки разтвори. Пост-хок анализът сочи, че шам-оперираните групи с инфузия на Анг II (контролни и с епилепсия) се характеризират с анхедония и през двете фази на денонощния цикъл (^o $p < 0.05$) (Фиг. 7), докато КА-шам групата проявява депресивно поведение, изразено с намалена консумация на захарен разтвор, само през светлата фаза ($p < 0.05$).



Фиг. 7 Ефекти на Анг II върху денонощни вариации на депресивен тип поведение, отчетено при тест за предпочитанието към сладки разтвори (%). Данните са представени като mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ спрямо К-шам; ° $p < 0.05$ спрямо КА-шам; # $p < 0.05$ вътре в групата.

4.1.2.4. Влияние на Анг II върху хипокамп-зависима пространствена памет

При RAM теста, трифакторният ANOVA показва достоверен ефект на факторите Епилепсия: [$F_{1,242}=17.715$, $p < 0.001$] и Ден на тренировка: [$F_{1,242}=4.219$, $p < 0.001$] без взаимодействие между тях по отношение на грешките на оперативната памет. За разлика от двете групи с епилепсия (КА-шам и КА-Анг II) (* $p < 0.05$) (Фиг. 8) и двете контролни групи К-шам и К-Анг II успешно научават задачата с намаляване на броя на грешките на оперативната памет в рамките на 18-дневен период на трениране ($^+p < 0.05$) спрямо първия ден на тренировка.

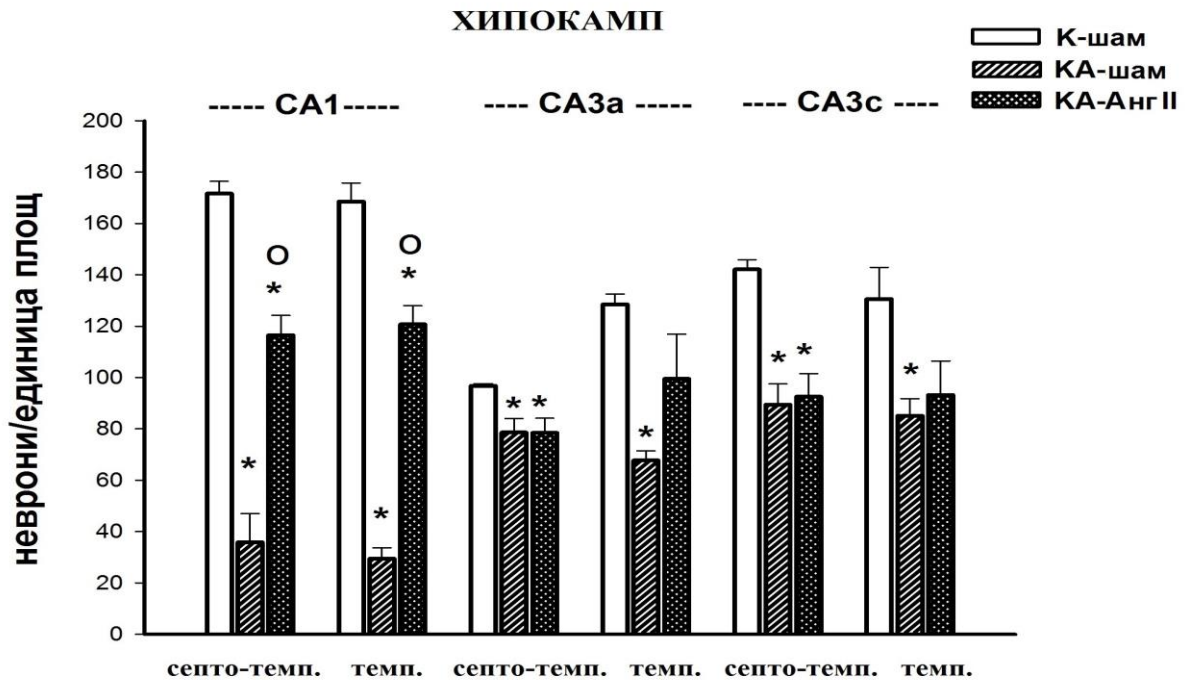


Фиг. 8 Ефекти на Анг II върху хипокамп-зависима пространствена памет отчетени чрез брой грешки на оперативната памет (с изключение на 1-ва сесия, останалите са обединени по три при отчитане). Данните са представени като mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ спрямо К-шам; + $p < 0.05$ спрямо 1-ва сесия вътре в групата.

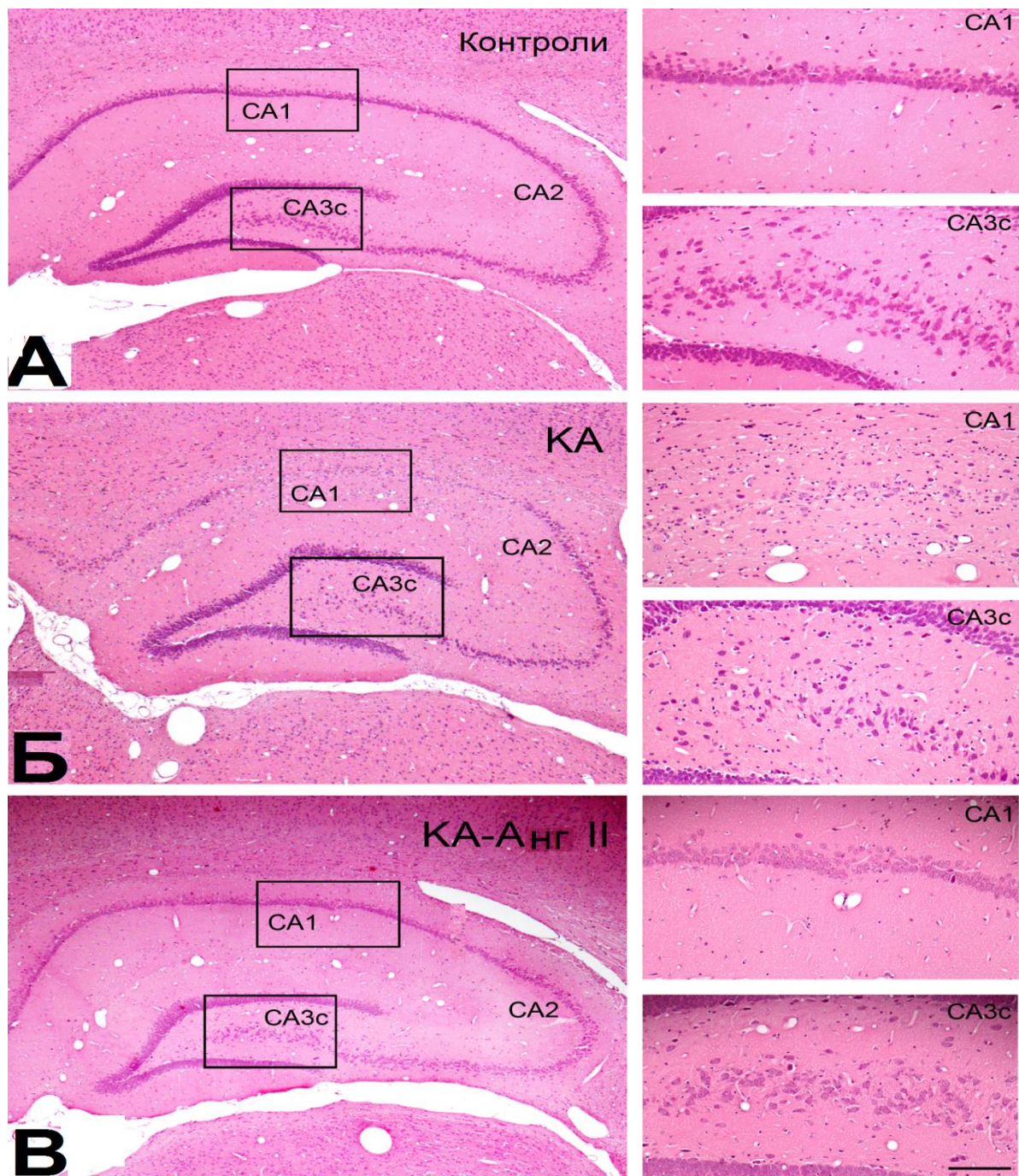
4.1.3. Влияние на Анг II върху невронална загуба в лимбични структури

Двухфакторният дисперсионен анализ показва за СА1 поле на хипокамп: 1) (септо-темпорално) ефект на фактора Епилепсия: [$F_{1,9}=7.264$, $p < 0.031$] и 2) (темпорално) – Епилепсия: [$F_{1,9}=278.735$, $p < 0.001$] и Анг II: [$F_{1,9}=120.05$, $p < 0.001$]; за СА3а поле на хипокамп: 1) (септо-темпорално) ефект на фактора Епилепсия: [$F_{1,9}=21.397$, $p < 0.002$] и 2) (темпорално) Епилепсия: [$F_{1,9}=278.735$, $p < 0.001$] и Анг II: [$F_{1,9}=5.837$, $p < 0.046$]; за СА3с поле на хипокамп 1) (септо-темпорално) ефект на фактора Епилепсия: [$F_{1,9}=20.764$, $p < 0.002$] и 2) (темпорално) Епилепсия: [$F_{1,9}=8.003$, $p < 0.022$]. Пост-хок анализът демонстрира повишена невронална загуба в полета СА1 (септо-темпорално и темпорално), СА3а (септо-темпорално и темпорално) и СА3с (септо-темпорално и темпорално) при шам-оперираната група с епилепсия (* $p < 0.05$) (Фиг. 9 и 10А, Б, В). Продължителната инфузия на Анг II по време на епилептогенезата оказва невропротективен ефект селективно в СА1 полето на хипокампа ($^{\circ}p < 0.05$),

докато невроналната загуба в темпоралната част на СА3а и СА3с полета сочи тенденция за намаляване, но без отчетена статистически достоверна разлика спрямо шам-оперираната група с КА.



Фиг. 9 Ефекти на Анг II върху невронална загуба (брой неврони на единица площ) в хипокамп. Данните са представени като mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ спрямо К-шам; ° $p < 0.05$ спрямо КА-шам



Фиг. 10 (А, Б, В) Фотомикроскопска снимка на срез от хипокам

Ефект на 28-дневна интрацеребровентрикуларна инфузия с Анг II върху невронална загуба: А) Контролна група с разтворител (К-шам) - пирамидните неврони от всички хипокампадни сектори са плътно разположени и интензивно оцветени при контролни плъхове Б) Група с епилепсия (КА-шам) - наблюдава се намаление в броя на пирамидните неврони и тяхното оцветяване и в трите полета В) Група с епилепсия третирана с Анг II (КА-Анг II) - наблюдава се по-интензивно оцветяване и по-голяма плътност в СА1 полето

4.2. Ефекти на лосартан върху интензитета на гърчова активност при КА-индуциран епилептичен статус и развитие на оксидативен стрес при спонтанно хипертензивни SHR и нормотензивни Wistar плъхове

4.2.1. Индуциране на епилептичен статус

Невротоксинът КА, инжектиран еднократно в конвулсивна доза от 12 mg/kg, предизвика поява на епилептичен статус, характеризиращ се с изразени поведенчески пристъпи с прогресия в интензитета и продължителността им. Хипертензивните шам-оперирани плъхове имат по-къс латентен период за поява на клонични пристъпи от клас III-V в сравнение с шам-оперираните Wistar плъхове (*p=0.01) (Таблица 1). Субхроничната инфузия с лосартан в доза от 10 mg/kg в продължение на 14 дни преди КА тест не променя латентния период за поява на клонични пристъпи спрямо инфузираните с разтворител нормотензивни животни, но предизвиква статистически достоверно удължаване у хипертензивните плъхове (**p=0.016). Селективният AT1 рецепторен антагонист не оказва влияние върху интензитета на пристъпите при двете породи плъхове.

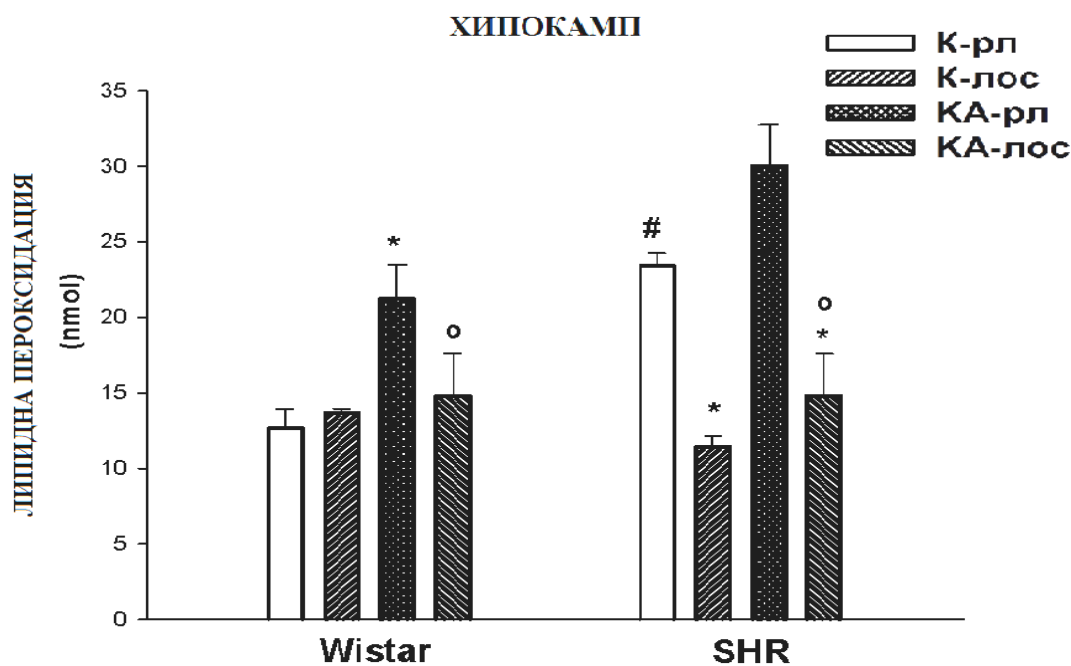
Таблица 1 - Ефекти на претретиране с лосартан върху КА-индуциран епилептичен статус при спонтанно хипертензивни SHR и нормотензивни Wistar плъхове. Появата и интензитета на гърчова активност се отчита в продължение на 4 часа.

Група	Пристъпи (n/N) (n=брой плъхове с клонични пристъпи /N=брой плъхове в група)	Латентен период (минути) за поява на пристъпи	Интензитет на пристъпите (скала на Racine, 1972)
Wis-K-рл	0/10	NA	0
Wis-K-лос	0/10	NA	0
Wis-KA-рл	9/10	86.50±4.41	4.2±0.3
Wis-KA-лос	5/10	86.0±9.61	2.9±0.5
SHR-K-рл	0/10	NA	0
SHR-K-лос	0/10	NA	0
SHR-KA-рл	9/10	64.1±2.1*	3.7±0.47
SHR-KA-лос	7/10	89±13.2**	3.6±0.4

*p=0.01 спрямо Wis-KA-рл, **p=0.016 спрямо SHR-KA-рл (t-тест)

4.2.2. Ефекти на лосартан върху нивата на липидна пероксидация

Трифакторният дисперсионен анализ ANOVA показва влияние на факторите: Порода [$F_{1,68}=11.889$, $p<0.001$], третиране с КА [$F_{1,68}=14.395$, $p<0.001$], Лосартан [$F_{1,68}=13.397$, $p<0.001$] и взаимодействие между: Порода и Лосартан [$F_{1,68}=4.510$, $p<0.038$]. Спонтанно хипертензивните плъхове (третирани и нетретирани с КА) се характеризират с повишени нива на липидни пероксиди в хипокамп в сравнение с нормотензивните ($^{\#}p<0.05$) (Фиг. 11). Субхроничната инфузия с лосартан значително потиска липидната пероксидация при шам-оперираните хипертензивни плъхове, третирани с физиологичен разтвор ($*p=0.020$ спрямо SHR-К-рл). Селективният AT1 рецепторен антагонист статистически значимо облекчава КА-предизвиканото нарастване на липидни пероксиди в хипокамп и при двете породи плъхове ($^{\circ}p=0.014$).

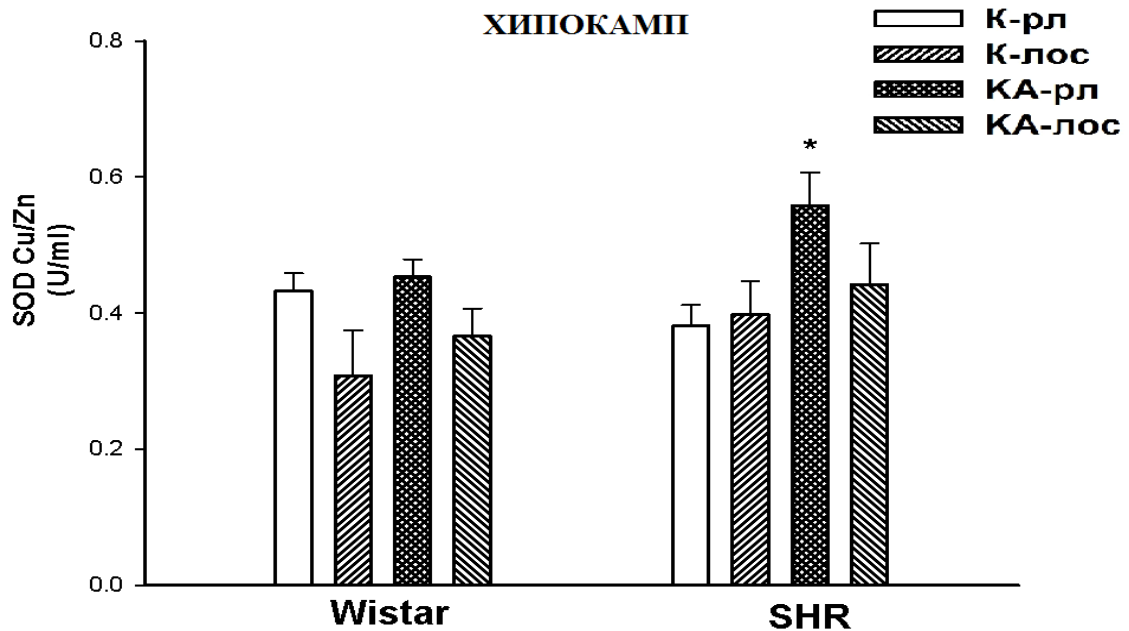


Фиг. 11 Ефекти на субхронична инфузия с лосартан (10 mg/kg/ден/14 дни) върху промените в липидната пероксидация вследствие епилептичен статус предизвикан с КА в хипокамп. Данните са представени като mean \pm S.E.M. $*p<0.05$ спрямо К-рл; $^{\circ}p <0.05$ спрямо КА-рл; $^{\#}p<0.05$ спрямо Wistar порода.

4.2.3. Ефекти на лосартан върху активността на цитозолната супероксид дисмутаза (SOD Cu/Zn)

Трифакторният ANOVA анализ показва влияние на фактора: третиране с КА [$F_{1,72}=5.462$, $p<0.023$]. Субхроничната инфузия с лосартан потиска КА-индуцираното

адаптивно повишение на активността на цитозолния антиоксидантен ензим SOD Cu/Zn в хипокамп при SHR плъхове ($^{\circ}p < 0.001$) (Фиг.12).



Фиг.12 Ефекти на субхронична инфузия с лосартан (10 mg/kg/ден/14 дни) върху промените в цитозолна супероксид дисмутаза SOD Cu/Zn вследствие епилептичен статус предизвикан с КА в хипокамп. Данните са представени като mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ спрямо K-рл; $^{\circ}p < 0.05$ спрямо КА-рл; # $p < 0.05$ спрямо Wistar порода.

4.3. Ефекти на лосартан върху епилептиформна активност, поведенчески промени, невронална загуба и експресия на AT1 рецептори в хипокамп през хроничната фаза на темпорална епилепсия при спонтанно хипертензивни SHR и нормотензивни Wistar плъхове

4.3.1. Латентен период и честота на спонтанна гърчова активност

Wistar плъхове

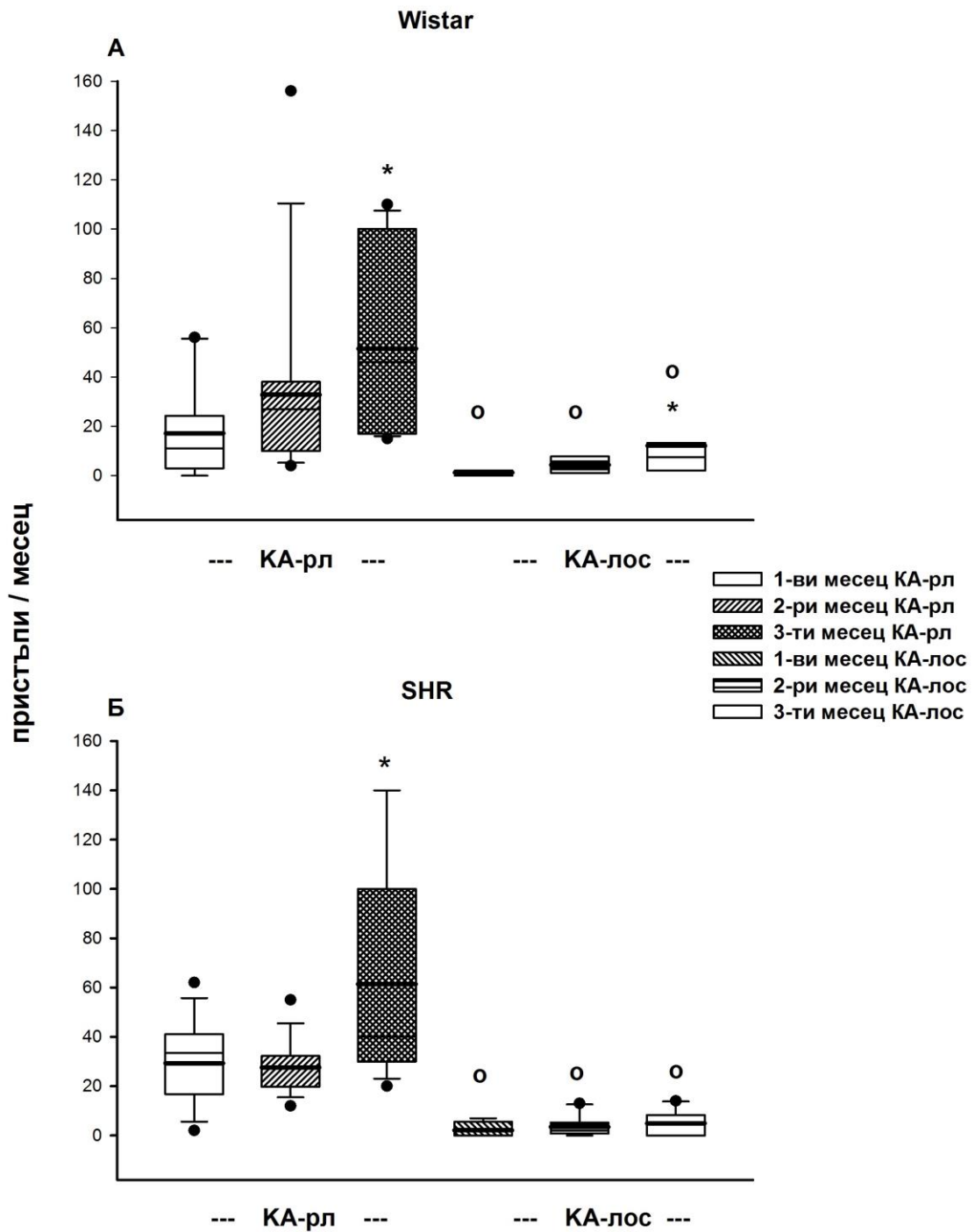
Продължителното третиране с лосартан след ЕС значително увеличава латентния период до поява на първия СМП за порода Wistar плъхове (КА-лос) (медиана: 28 дни, диапазон: 7-86 дни) в сравнение с този на третираната с разтворител епилептична група (КА-рл) (медиана: 15 дни, диапазон: 6-67 дни) (Mann-Whitney U-тест: $p = 0.017$). Еднофакторният дисперсионен анализ ANOVA показва влияние на фактора Време: ($H = 49.753$, $p = 0.001$) върху честотата на СМП. Прогресия в честотата на СМП е отчетено и при двете нормотензивни групи с епилепсия: Wis-КА-рл, и Wis-КА-

лос ($^{\circ}p < 0.05$, 3-тият спрямо 1-вия месец) (Фиг. 13А). Третираната с лосартан група се характеризира с по-малка честота на СМП в сравнение с третираната с разтворител както по време на приема на лосартан (1-ви месец), така и след преустановяването му ($*p < 0.05$, 2-ри и 3-ти месец, съответно). Най-ниска честота на СМП при Wis-КА-лос групата е отчетена по време на третирането ($^{\circ}p < 0.05$, 1-ви месец).

SHR плъхове

Продължителното третиране с лосартан след ЕС значително увеличава латентния период до поява на първия СМП за порода SHR плъхове (КА-лос) (медиана: 23 дни, диапазон: 9-99 дни), в сравнение с този на третираната с разтворител епилептична група (КА-рл) (медиана: 12 дни, диапазон: 5-26 дни) (Mann-Whitney U-тест: $p = 0.022$). Еднофакторният ANOVA анализ показва влияние на фактора Време: ($N = 30.355$, $p = 0.001$) върху честотата на СМП. Статистически достоверна прогресия в честотата на СМП при хипертензивните плъхове е установена само при третираната с разтворител епилептична група (КА-рл) ($*p < 0.05$) (Фиг. 13Б). Третираната с лосартан група не показва прогресия на СМП нито по време на приема на лосартан (1-ви месец), нито след преустановяването му (2-ри и 3-ти месец) ($^{\circ}p < 0.05$).

ЧЕСТОТА НА СПОНТАННИ МОТОРНИ ПРИСТЪПИ



Фиг. 13 (А, Б) Ефекти на лосартан върху честотата на спонтанни моторни пристъпи през 1-ви, 2-ри и 3-ти месец след КА-индуциран ЕС (24 часа видео наблюдение) А) Wistar Б) SHR. Данните представят брой пристъпи на месец на КА-рл и КА-лос групите, съответно. Третият месец с лосартан започва 2 часа след ЕС и е с продължителност 4 седмици. * $p < 0.05$ вътре в групата; $^{\circ}p < 0.05$ между групите (спрямо КА-рл).

4.3.2. Влияние на лосартан върху поведенческите промени през хроничната фаза на епилепсията

4.3.2.1. Двигателна активност

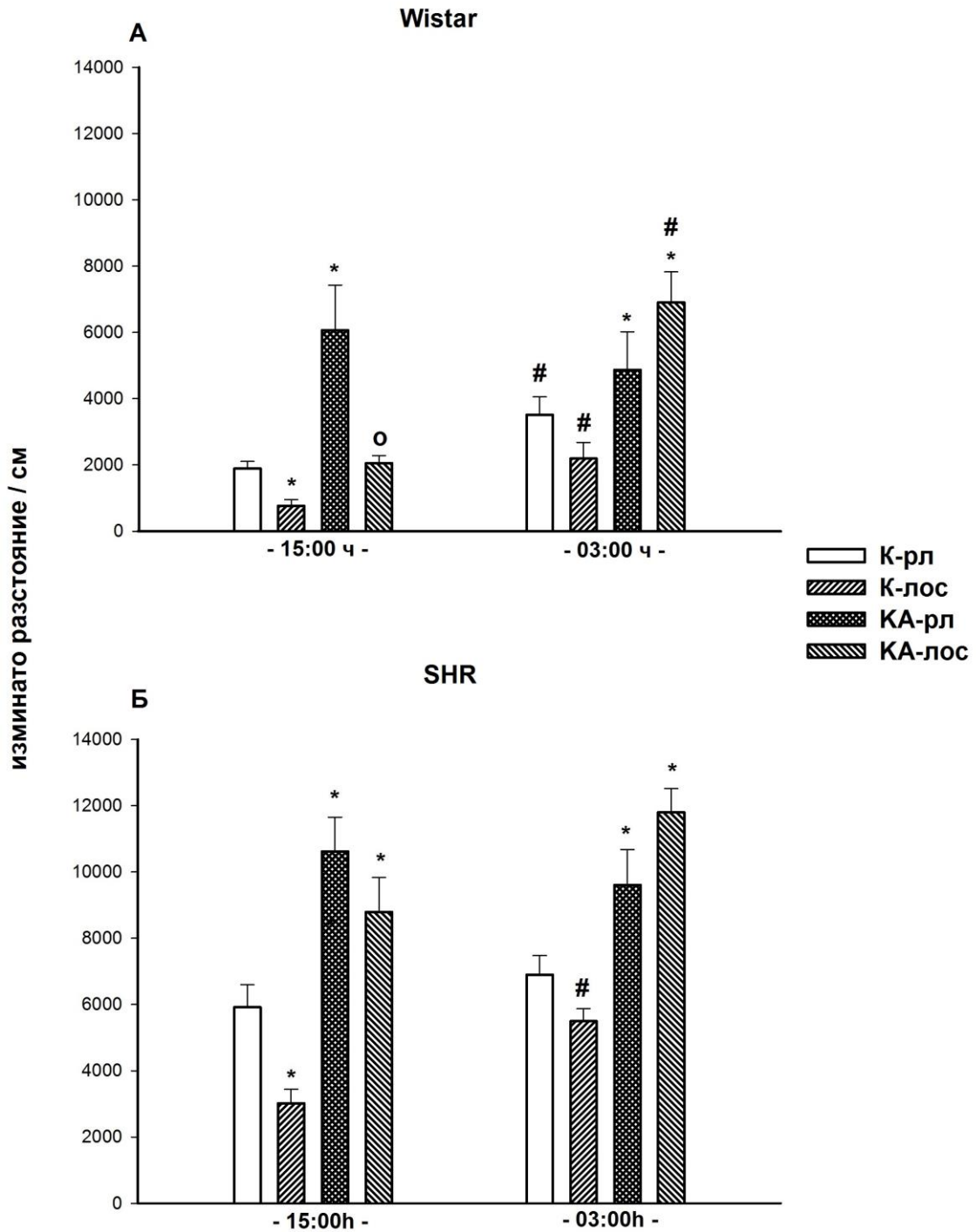
Wistar плъхове

Трифакторният дисперсионен анализ ANOVA показва влияние на факторите Фаза: [$F_{1.88}=7.191$, $p<0.009$], Епилепсия: [$F_{1.88}=18.631$, $p<0.001$] и взаимодействие между факторите Фаза x Лосартан: [$F_{1.88}=3.743$, $p<0.05$] върху общата двигателна активност при OF тест. Според пост-хок анализът групите без епилепсия (К-рл и К-лос) се характеризират с по-голямо изминато разстояние през тъмната фаза в сравнение със светлата ($\#p<0.05$), а третираната с лосартан контролна група показва понижена локомоция през светлата фаза на денонощието ($*p<0.05$) (Фиг. 14А). При епилептичната група, лосартанът облекчава хиперлокомоцията характерна за групата с епилепсия и третирана с разтворител и възстановява денонощните вариации на двигателна активност ($^{\circ}p<0.05$).

SHR плъхове

Трифакторният дисперсионен анализ ANOVA показва влияние на факторите Фаза: [$F_{1.90}=12.880$, $p<0.009$] и Епилепсия: [$F_{1.90}=64.689$, $p<0.001$] върху общата двигателна активност при OF тест. Контролната група третирана с лосартан се характеризира с денонощни флукуации на локомоторна активност ($\#p<0.05$), както и понижена локомоция в сравнение с третираната с разтворител контролна група през светлата фаза на денонощието ($\#*p<0.05$) (Фиг. 14Б). Третирането с лосартан не повлиява КА-индуцираната повишена хиперлокомоция ($p>0.05$).

ОБЩАТА ДВИГАТЕЛНА АКТИВНОСТ
OF TEST



Фиг. 14 (А, Б) Ефекти на лосартан върху денонощни вариации на общата двигателна активност, измерена с изминато разстояние в см при OF тест А) Wistar Б) SHR. Данните са представени като mean ± S.E.M. * $p < 0.05$ спрямо K-рл; ^o $p < 0.05$ спрямо КА-рл; # $p < 0.05$ вътре в групата.

4.3.2.2. Състояние на безпокойство

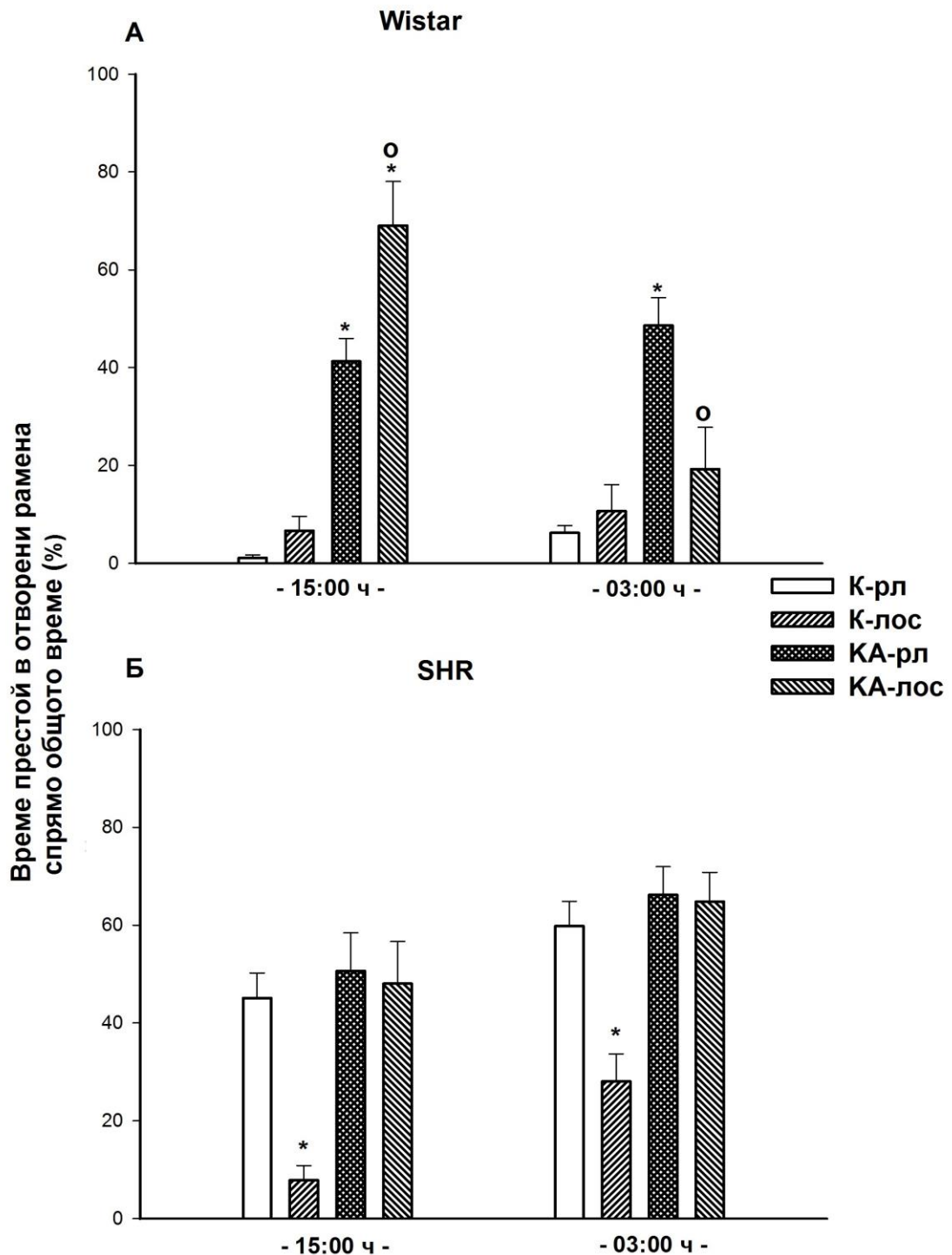
Wistar плъхове

При ЕРМ теста, трифакторният дисперсионен анализ ANOVA показва влияние на факторите Епилепсия: [$F_{1.72}=96.575$, $p<0.001$] и Фаза: [$F_{1.72}=6.941$, $p<0.001$], а също и Епилепсия x Лосартан x Фаза взаимодействие: [$F_{1.72}=14.550$, $p<0.001$] за съотношението на време престой в отворените рамена спрямо общото време на теста. Импулсивния тип поведение, характерен за КА-третираните плъхове, характеризиращи се със занижено ниво на безпокойство, се потвърждава от пост-хок анализът и през двете фази на денонощния цикъл (* $p<0.05$) (Фиг. 15А). Третирането с лосартан премахва патологично намаленото ниво на безпокойство само през тъмната фаза на денонощния цикъл ($^{\circ}p<0.05$).

SHR плъхове

При ЕРМ теста, трифакторният ANOVA показва влияние на факторите Лосартан: [$F_{1.90}=15.439$, $p<0.001$] и Фаза: [$F_{1.90}=13.101$, $p<0.001$] за съотношението на време престой в отворените рамена спрямо общото време на теста. Лосартанът оказва анксиогенен ефект при контролната група, измерен с по-малко време престой в отворените рамена, и през светлата и през тъмната фази на денонощния цикъл (* $p<0.05$) (Фиг. 15Б).

СЪСТОЯНИЕ НА БЕЗПОКОЙСТВО
EPM ТЕСТ



Фиг. 15 (А, Б) Ефекти на Анг II върху денонощни вариации на състояние на безпокойство измерено с време престой в отворени рамена спрямо общото време А) Wistar Б) SHR. Данните са представени като mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ спрямо K-рл; $^{\circ}p < 0.05$ спрямо КА-рл; $^{\#}p < 0.05$ вътре в групата.

4.3.2.3. Влияние на лосартан върху коморбидна депресия

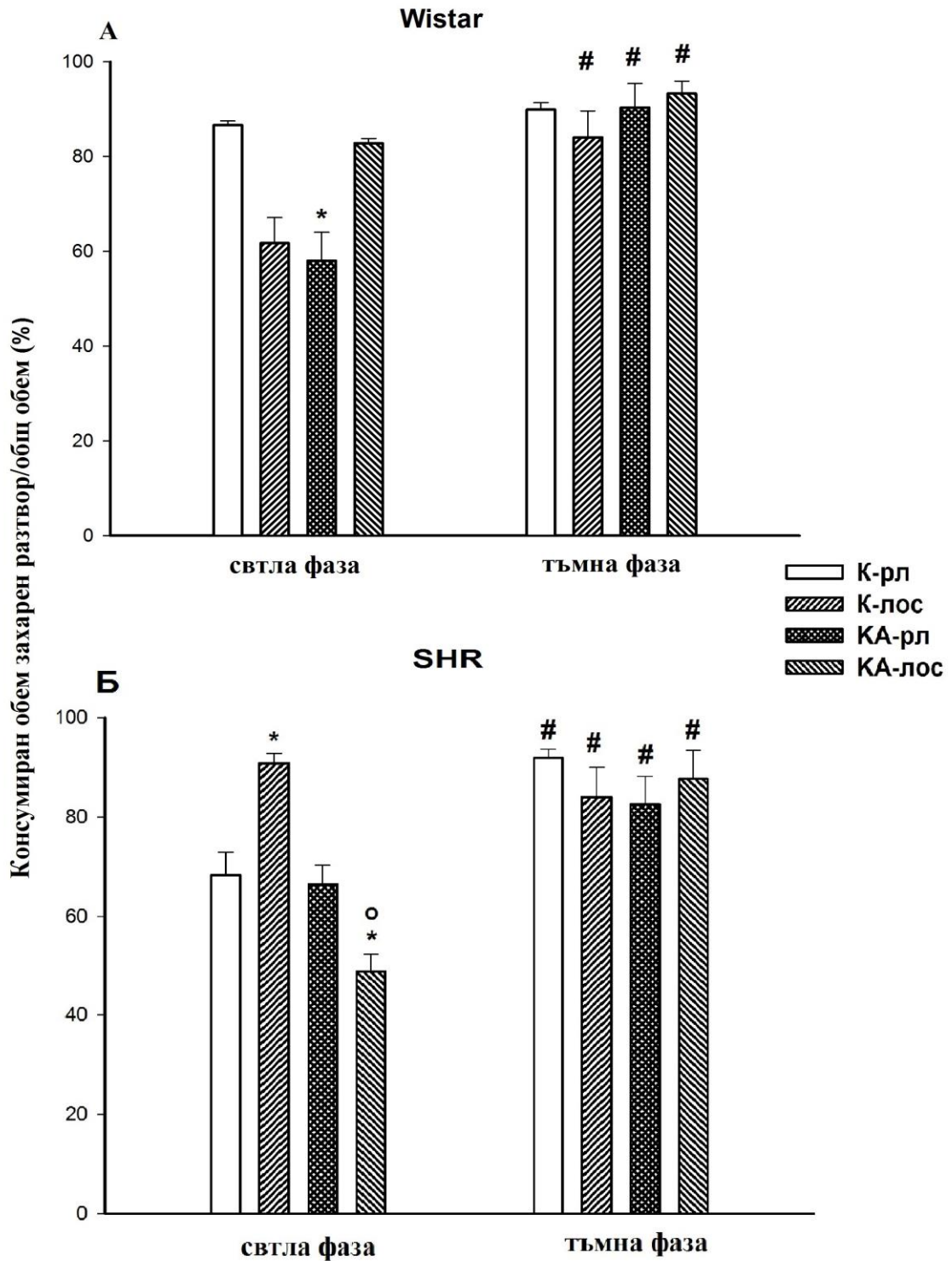
Wistar плъхове

Трифакторният ANOVA показва значимост на фактора Фаза: [$F_{1,90}=44.603$, $p<0.001$] с установено Епилепсия x Лосартан x Фаза взаимодействие: [$F_{1,90}=11.971$, $p<0.001$] върху предпочитанието към сладки разтвори. С изключение на третираната с разтворител контролна група, останалите групи отбелязват денонощни флукуации с по-голямо предпочитание към пиене на сладки разтвори през тъмната фаза ($\#p<0.05$) (Фиг. 16А). Пост-хок анализът показва намалена консумация на захарен разтвор при КА-рл групата през светлата фаза на денонощния цикъл ($*p<0.05$). Един месец след преустановяване на третирането с лосартан, групата с епилепсия показва подобно на контролната група третирана с разтворител увеличено предпочитание към сладки разтвори.

SHR плъхове

Трифакторният ANOVA показва статистически значимост на факторите Фаза: [$F_{1,90}=26.925$, $p<0.001$] и Епилепсия: [$F_{1,90}=12.872$, $p<0.001$], както и Епилепсия x Лосартан x Фаза взаимодействие: [$F_{1,90}=14.802$, $p<0.001$] върху предпочитанието към сладки разтвори. С изключение на контролната група третирана с лосартан, която не показва денонощни вариации в консумацията на захарен разтвор, останалите групи се характеризират с по-голямо предпочитание към пиене на сладки разтвори през тъмната фаза ($\#p<0.05$) (Фиг. 16Б). За разлика от групата с епилепсия третирана с разтворител, третираната с лосартан група се характеризира с анхедония през светлата фаза на денонощния цикъл ($*p<0.05$).

ТЕСТ ЗА ПРЕДПОЧИТАНИЕ КЪМ СЛАДКИ РАЗТВОРИ



Фиг. 16 (А, Б) Ефекти на лосартан върху денонощни вариации на депресивен тип поведение отчетено при тест за предпочитанието към сладки разтвори (%) А) Wistar Б) SHR. Данните са представени като mean ± S.E.M. *p<0.05 спрямо К-рл; °p <0.05 спрямо КА-рл; #p<0.05 вътре в групата.

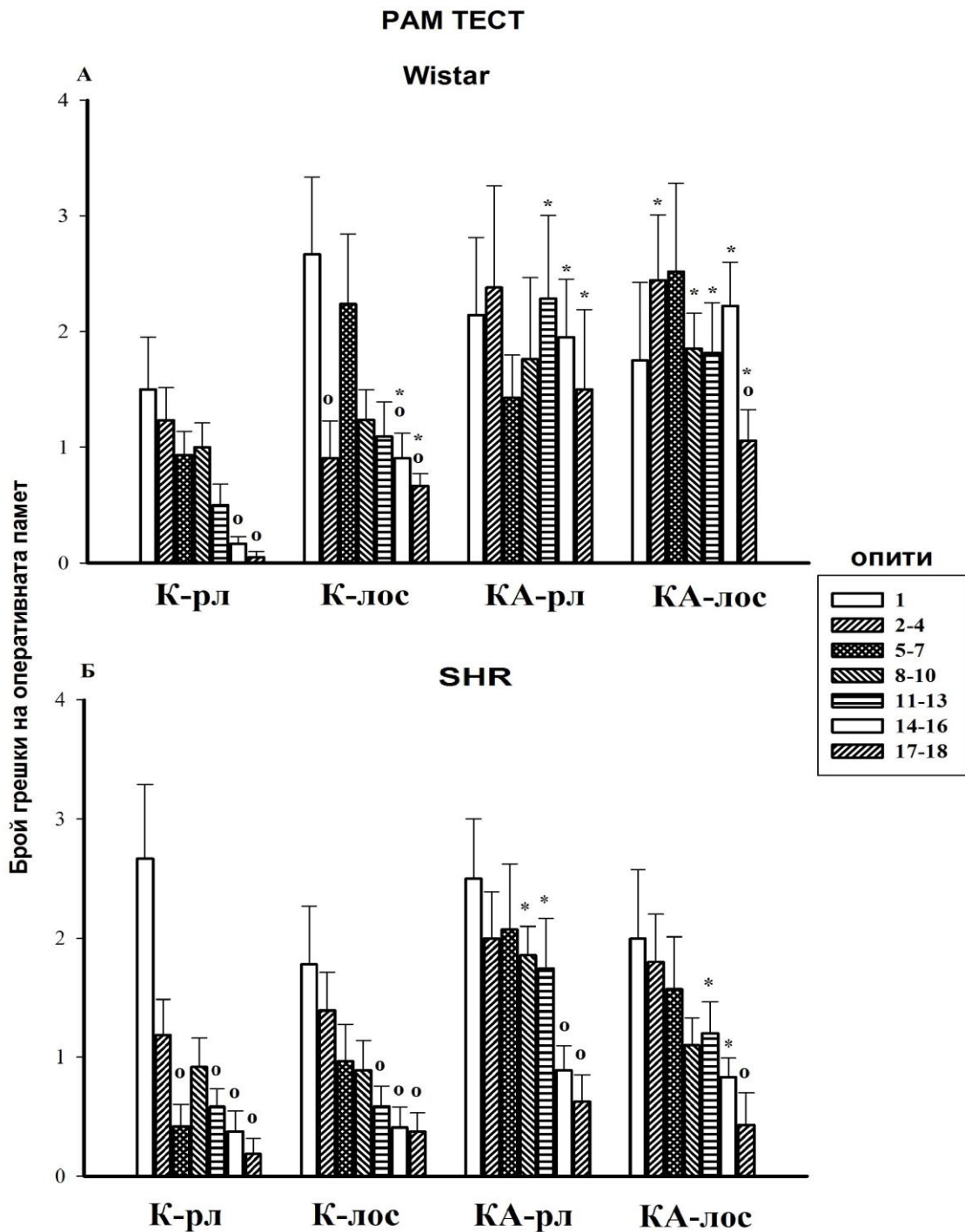
4.3.2.4. Влияние на лосартан върху хипокамп-зависима пространствена памет

Wistar плъхове

При RAM теста, трифакторният ANOVA показва достоверен ефект на трите фактора Епилепсия: [$F_{1,225}=22.637$, $p<0.001$], Лосартан: [$F_{1,225}=3.960$, $p<0.048$] и Ден на тренировка: [$F_{6,225}=3.129$, $p<0.003$] без взаимодействие между факторите по отношение на грешките на оперативната памет. И двете контролни групи, третирана с разтворител и третирана с лосартан намаляват броя на грешките на оперативната памет във времето, в рамките на 18-дневен период на трениране спрямо първия ден на тренировка ($^{\circ}p<0.05$) (Фиг. 17А). За разлика от КА-рл, КА-лос групата показва подобрене работната памет с показани по-малко грешки, което предполага успешно заучаване на задачата ($^{\circ}p<0.05$).

SHR плъхове

При RAM теста, трифакторният ANOVA показва значимост на факторите Епилепсия: [$F_{1,244}=18.029$, $p<0.001$] и Ден на тренировка: [$F_{6,244}=11.928$, $p<0.001$] без взаимодействие между факторите по отношение на грешките на оперативната памет. Подобно на двете контролни групи, SHR-К-рл и SHR-К-лос, и двете групи с епилепсия SHR-КА-рл и SHR-КА-лос показват намален брой на грешките на оперативната памет, което сочи, че животните научават задачата ($^{\circ}p<0.05$) (Фиг. 17 Б).



Фиг. 17 (А, Б) Ефекти на лосартан върху хипокамп-зависима пространствена памет, отчетено чрез брой грешки на оперативната памет (с изключение на 1-вата сесия, останалите са обединени по 3) А) Wistar Б) SHR. Данните са представени като mean ± S.E.M. *p<0.05 спрямо К-рл; °p<0.05 спрямо 1-вия опит вътре в групата.

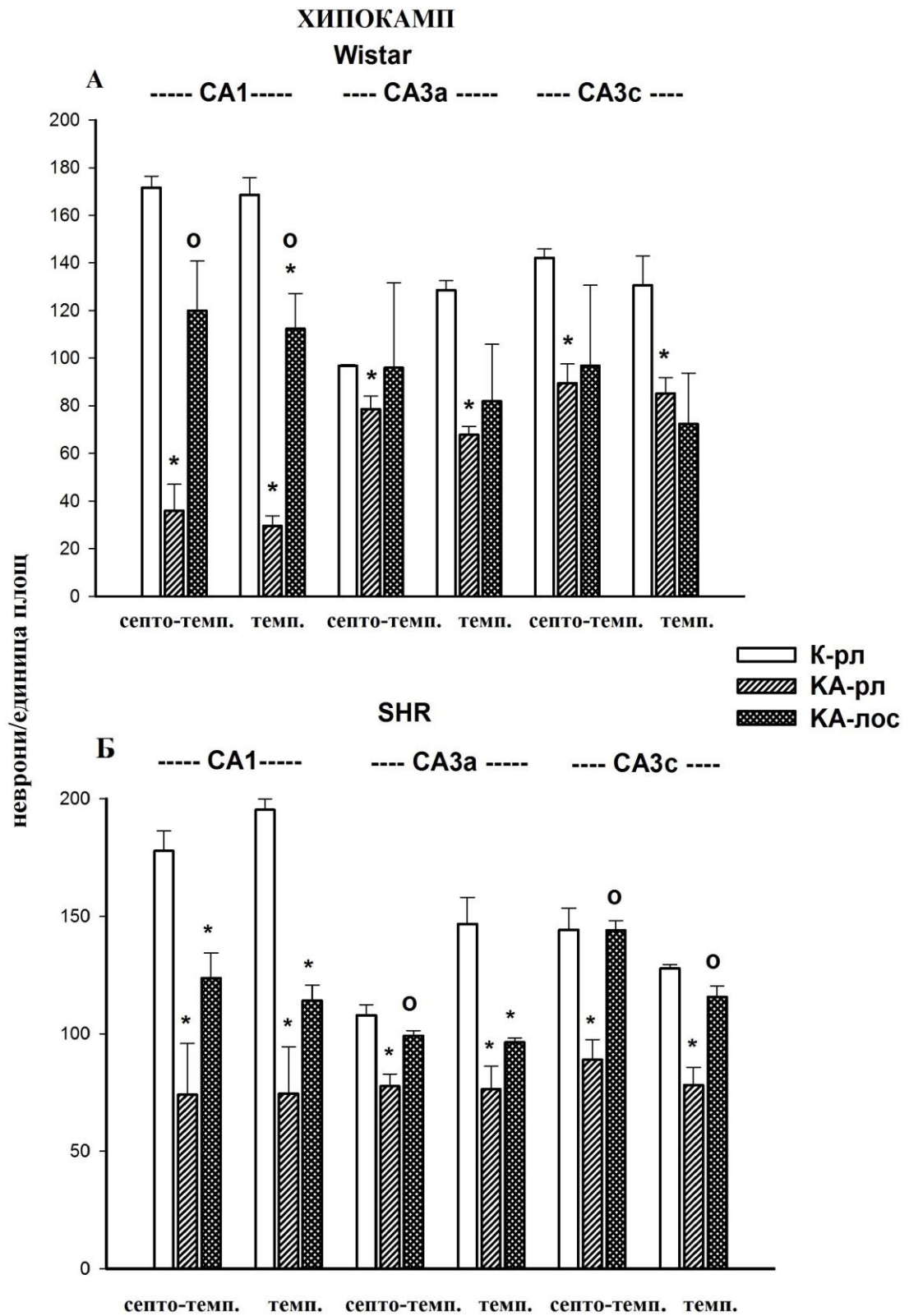
4.3.3. Влияние на лосартан върху невронална загуба в лимбични структури

Wistar плъхове

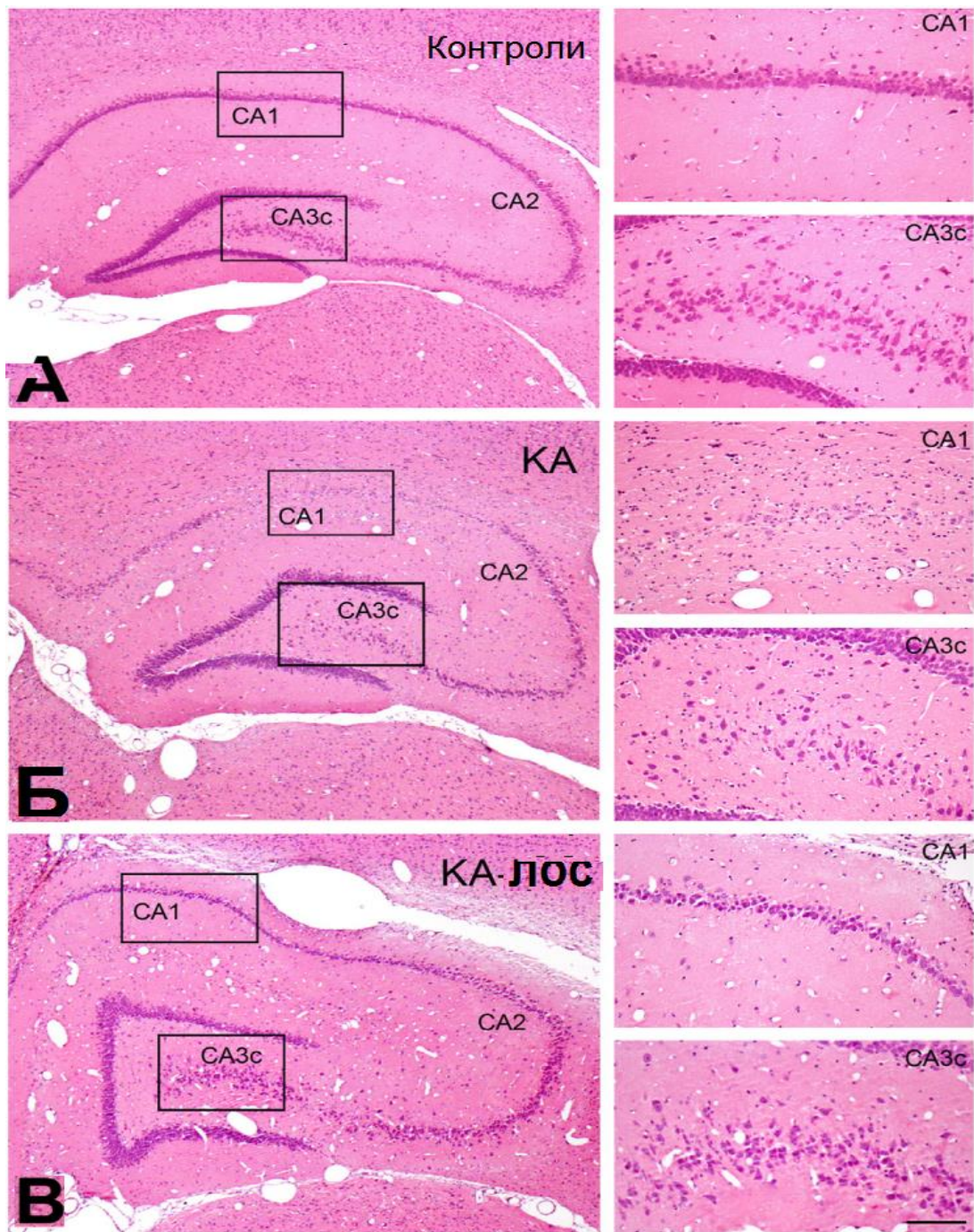
Двуфакторният дисперсионен анализ показва за СА1 поле на хипокамп: 1) (септо-темпорално) ефект на факторите Епилепсия: [$F_{1,8}=76.076$, $p<0.031$] и Лосартан: [$F_{1,8}=22.693$, $p<0.003$] 2) (темпорално) – Епилепсия: [$F_{1,9}=125.803$, $p<0.001$] и Лосартан: [$F_{1,9}=44.660$, $p<0.001$]; за СА3а поле на хипокамп: 1) (темпорално) ефект на фактора Епилепсия: [$F_{1,9}=12.017$, $p<0.010$]; за СА3с поле на хипокамп: 1) (септо-темпорално) ефект на фактора Епилепсия: [$F_{1,8}=9.039$, $p<0.024$] и 2) (темпорално) Епилепсия: [$F_{1,8}=5.923$, $p<0.045$]. Пос-хок анализът сочи повишена невронална загуба в полета СА1 (септо-темпорално и темпорално), СА3а (септо-темпорално и темпорално) и СА3с (септо-темпорално и темпорално) при групата с епилепсия (* $p<0.05$) (Фиг. 18А и 19А,Б,В). Продължителното третиране с лосартан по време на епилептогенезата оказва невропротективен ефект селективно в СА1 полето на хипокампа ($^{\circ}p<0.05$), а невроналната загуба в СА3а полето и в септо-темпоралната част на СА3с полето е намалена, но без да се отчита статистически достоверна разлика спрямо нетретираната група с епилепсия.

SHR плъхове

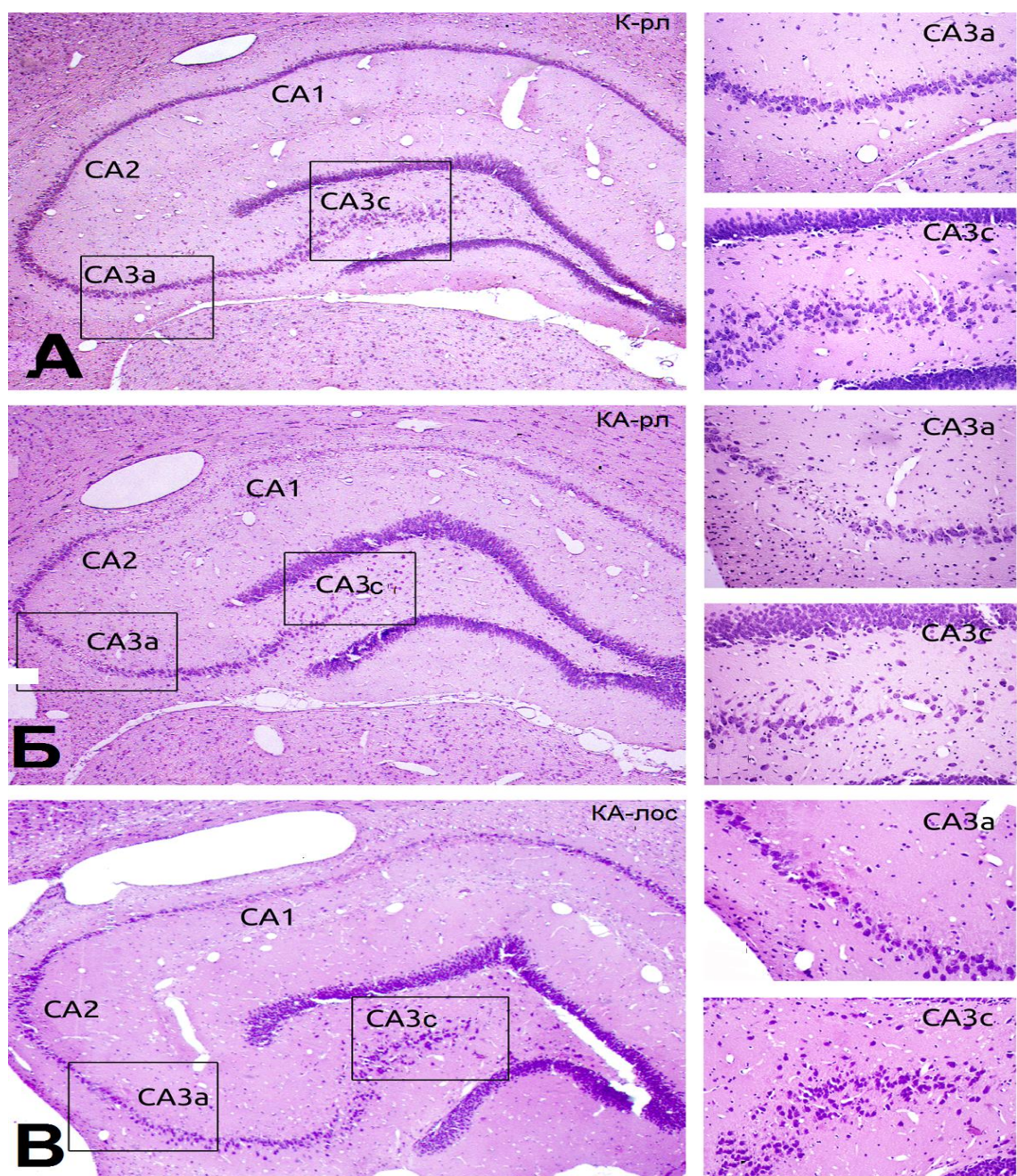
Двуфакторният дисперсионен анализ показва за СА1 поле на хипокамп: 1) (септо-темпорално) ефект на фактора Епилепсия: [$F_{1,9}=15.234$, $p<0.005$] 2) (темпорално) – Епилепсия: [$F_{1,9}=26.432$, $p<0.001$]; за СА3а поле на хипокамп: 1) (септо-темпорално) ефект на фактора Епилепсия: [$F_{1,9}=20.393$, $p<0.002$] и Лосартан: [$F_{1,9}=10.203$, $p<0.013$] 2) (темпорално) Епилепсия: [$F_{1,9}=27.089$, $p<0.001$]; за СА3с поле на хипокамп: 1) (септо-темпорално) ефект на фактора Епилепсия: [$F_{1,9}=16.125$, $p<0.004$] и Лосартан: [$F_{1,9}=7.350$, $p<0.0027$] 2) (темпорално) Епилепсия: [$F_{1,9}=28.693$, $p<0.001$] и Лосартан: [$F_{1,9}=16.441$, $p<0.041$]. Пост-хок анализът сочи повишена невронална загуба в полета СА1 (септо-темпорално и темпорално), СА3а (септо-темпорално и темпорално) и СА3с (септо-темпорално и темпорално), съответно, при КА-третираната група (* $p<0.05$) (Фиг. 18Б и 20А,Б,В). Продължителното третиране с лосартан по време на епилептогенезата оказва невропротективен ефект селективно в септо-темпорална и темпорална част на СА3с полето на хипокампа ($^{\circ}p<0.05$) и частично в септо-темпорална част на СА3а полето.



Фиг. 18 (А, Б) Ефекти на лосартан върху невроналната загуба (брой неврони в единица площ) в хипокамп А) Wistar Б) SHR. Данните са представени като mean ± S.E.M. *p<0.05 спрямо К-рл; °p<0.05 спрямо КА-рл.



Фиг. 19 (А, Б, В) Фотомикроскопска снимка на срез от хипокам, плъхове порода Wistar
 Ефект на лосартан върху невронална загуба: А) Контролна група с разтворител (К-рл) - пирамидните неврони от всички хипокампадни сектори са плътно разположени и интензивно оцветени в контролни плъхове Б) Група с епилепсия (КА-рл) - наблюдава се намаление в броя на пирамидните неврони и тяхното оцветяване и в трите полета В) Група с епилепсия третирана с лосартан (КА-лос) - наблюдава се по-интензивно оцветяване и по-голяма плътност в CA1 полето на хипокампа.

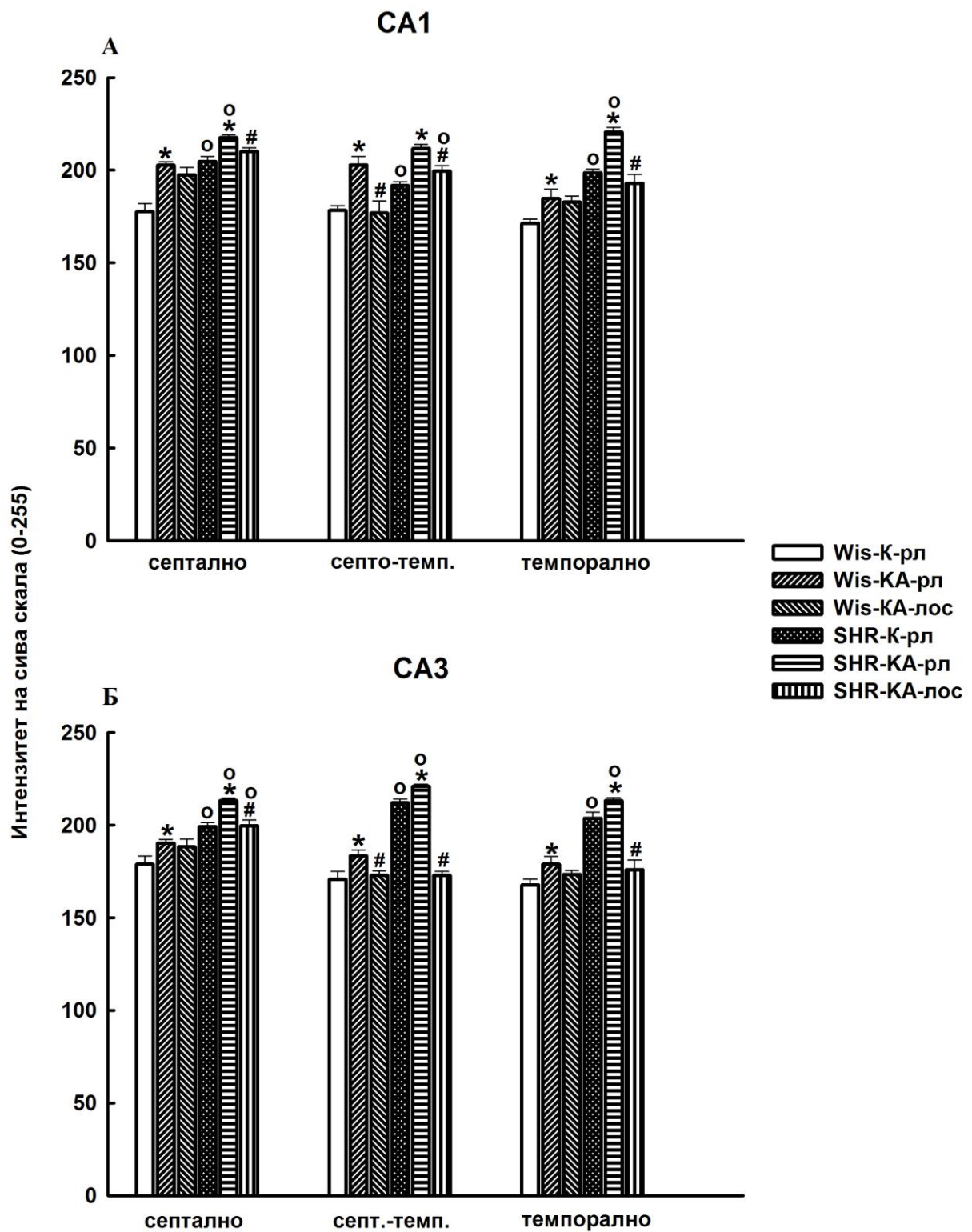


Фиг. 20 (А, Б, В) Фотомикроскопска снимка на срез от хипокам, плъхове порода SHR
 Ефект на лосартан върху невронална загуба: А) Контролна група с разтворител (К-рл) - пирамидните неврони от всички хипокампални сектори са плътно разположени и интензивно оцветени в контролни плъхове Б) Група с епилепсия (КА-рл) - наблюдава се намаление в броя на пирамидните неврони и тяхното оцветяване и в трите полета В) Група с епилепсия третирана с лосартан (КА-лос) - наблюдава се по-интензивно оцветяване и по-голяма плътност в СА3 полето.

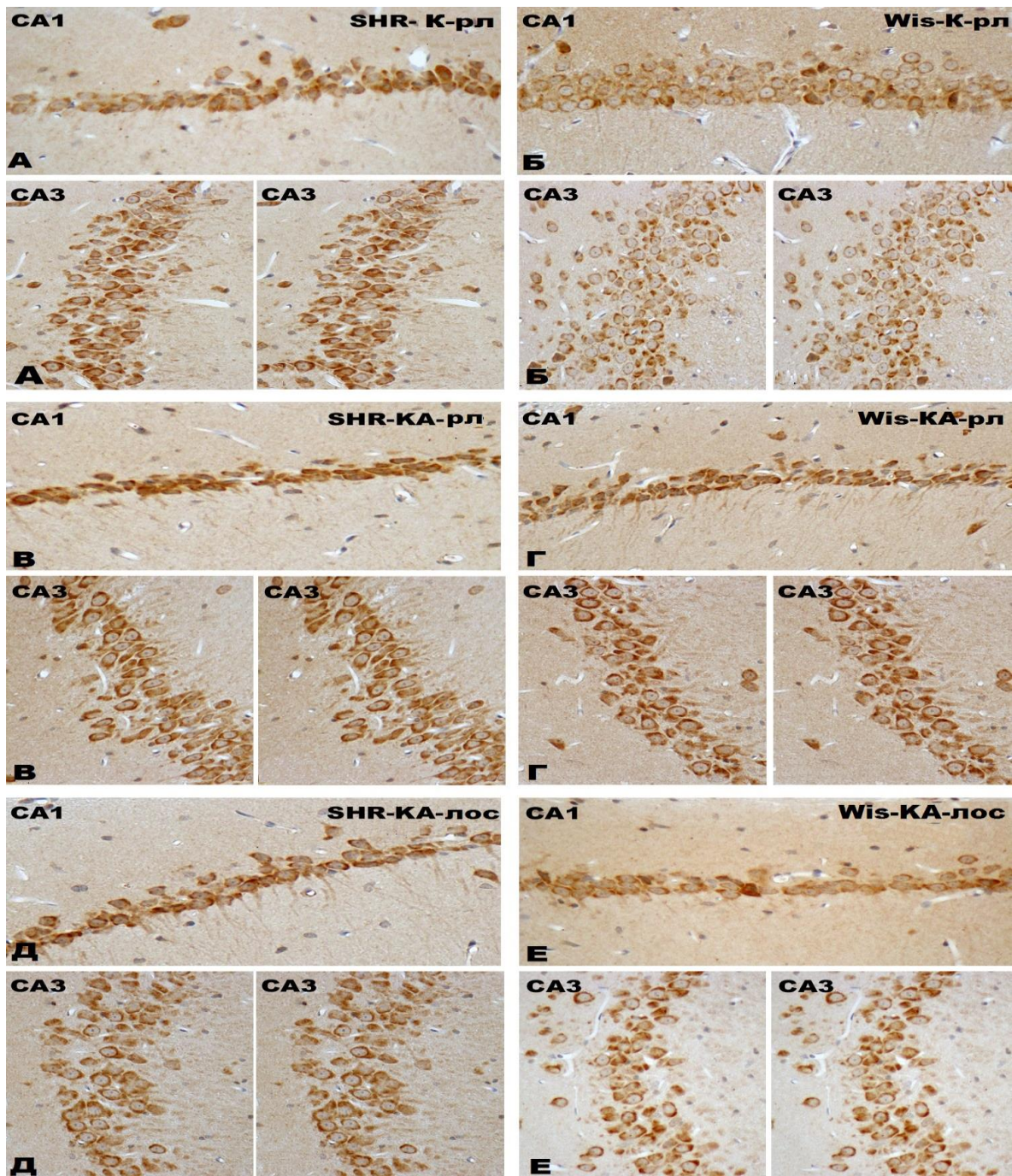
4.3.4. Влияние на лосартан върху промени в мозъчната експресия на АТ1 рецепторите при SHR и Wistar плъхове

За СА1 поле на хипокамп, двуфакторният ANOVA анализ показва взаимодействие на факторите: 1) (септално) Порода x Епилепсия: [$F_{1.360}=6.191$, $p<0.013$]; Порода x Лосартан: [$F_{1.421}=5.130$, $p<0.024$]; 2) (темпорално) Порода x Епилепсия: [$F_{1.326}=9.987$, $p<0.002$]; Порода x Лосартан: [$F_{1.253}=8.302$, $p<0.004$]. За СА3 поле на хипокамп: 1) (септално) Порода x Лосартан: [$F_{1.388}=47.305$, $p<0.001$]; 2) (темпорално) Порода x Лосартан: [$F_{1.386}=54.499$, $p<0.022$].

За разлика от нормотензивните Wistar плъхове, интактните SHR плъхове се характеризират с по-изразена експресия на АТ1 рецептори в СА1 и СА3 полета на хипокамп в сравнение с нормотензивните интактни Wistar плъхове ($^{\circ}p<0.05$) (Фиг. 21А, Б и 22А,Б,В,Г,Д,Е). Епилептичният статус, предизвикан с КА, повишава гъстота на АТ1 рецепторите през хроничната фаза на епилепсията в СА1 и СА3 полета и при двете породи плъхове ($*p<0.05$), а третирането с АТ1 рецепторния антагонист лосартан я потиска в СА1 и СА3 полета през хроничната фаза на епилепсия и при двете породи плъхове, но в по-голяма степен при хипертензивната порода ($^{\#}p<0.05$).



Фиг. 21 (А, Б) Ефекти на лосартан върху експресията на AT1 рецептори в дорзален хипокамп: А) CA1 и Б) CA3 полета при плъхове порода Wistar и SHR. Данните са представени като mean \pm S.E.M. от интензитета на оцветяване по Grey скала; * $p < 0.05$ спрямо К-рл; ^o $p < 0.05$ спрямо Wistar; # $p < 0.05$ спрямо КА-рл.



Фиг. 22 (А, Б, В, Г, Д, Е) Фотомикроскопска снимка на срез от хипокам

Имунохистохимична локализация на AT1 рецептори в хипокам на Wistar плъхове (дясна колона) и SHR плъхове (лява колона). Имунореактивност на AT1 рецептора в CA1 и CA3 полета на хипокам: контролни групи с разтворител А) SHR (SHR-К-рл) и Б) Wistar (Wis-К-рл); групи с епилепсия В) SHR (SHR-КА-рл) и Г) Wistar (Wis-КА-рл); групи с епилепсия, третирани с лосартан Д) SHR (SHR-КА-лос) и Е) Wistar (Wis-КА-лос)

ГЛАВА 5: ОБОБЩЕНО ОБСЪЖДАНЕ

Обобщавайки резултатите от така проведените изследвания представени в настоящия труд, се дискутират по-подробно тези, които потвърждават:

а) проконвулсивните ефекти проявени при хронична интрацеребровентрикуларна инфузия на Анг II са опосредствани от активиране на AT₁ рецепторите, а невропротективните в СА1 полето на дорзален хипокамп са медиирани от AT₂ рецепторите.

б) антиоксидантният ефект на AT₁ рецепторния антагонист приложен субхронично преди епилептичен статус предизвикан с каинова киселина при нормотензивни и спонтанно хипертензивни плъхове, предполага потискане образуването на свободни радикали в мозъчни структури, чувствителни към лимбични пристъпи.

в) многократното третиране с AT₁ рецепторния антагонист лосартан след епилептичен статус на нормотензивни и спонтанно хипертензивни плъхове има антиепилептогенен ефект при модел на темпорална епилепсия, който се дължи на активиране на AT₂ рецепторите от ендогенния Анг II.

г) блокирането на AT₁ рецепторите през епилептогенезата обуславя порода-зависими промени в поведенческите и невропротективни ефекти, което предполага пластични различия в разпределението на ангиотензиновите рецептори при модел на коморбидна хипертония и епилепсия.

д) блокирането на AT₁ рецепторите през епилептогенезата определя структура-специфични пластични промени в експресията им при нормотензивни и хипертензивни плъхове.

Хроничната интрацеребровентрикуларна инфузия на Анг II през епилептогенезата, от една страна снижава гърчово-пристъпния праг, а от друга, оказва невропротекция в СА1 поле на дорзален хипокамп. Показаното несъответствие с установения в предишни проучвания на нашия екип антиконвулсивен ефект на биологично активния октапептид при гърчови тестове върху интактни мишки (Georgiev et al., 1996; Tchekalarova and Georgiev, 2005) предполага, че използвания модел има съществено значение за предизвикване на анти- или проконвулсивни ефекти на Анг II. Редица литературни данни сочат, че Анг II осъществява или възбудни или инхибиторни ефекти върху невроналната възбудимост в различни области на мозъка (Albrecht et al., 1997; Armstrong et al., 1996; Naas et al., 1980; Palovcik et al., 1984), което предполага модулиращ механизъм на този невропептид чрез директно активиране на AT₁/AT₂

рецептори или пресинаптично/постсинаптично взаимодействие с инхибиторни или възбудни невротрансмитерни системи като ГАБА или глутамат, допамин или норепинефрин. В тази връзка, продължителното третиране с лосартан след епилептичен статус показва невропротективен ефект специфично в СА1 полето на хипокамп при нормотензивни плъхове с епилепсия. Антиоксидантният ефект оказан от лосартан по време на острата фаза на епилепсията, чрез потискане на оксидативния стрес предимно в хипокамп при плъхове, съответства на хипотезата, че блокирането на AT₁ рецепторите може да представлява важен невропротективен механизъм срещу КА-индуцираната невротоксичност. От друга страна, AT₁ рецептор-медираните отговори на Анг II включват повишено освобождаване на маркери на възпалителните реакции и оксидативен стрес като левкотриени, свободни радикали, С-реактивен протеин и простагландини (Das UN, 2005). Участието на AT₁ рецепторите в ТЕ се подкрепя от резултатите на няколко лаборатории, показали, че те претърпяват пластични промени в хипокамп както при експериментални модели на епилепсия (Pereira et al., 2010; Gouveia et al., 2012), така и при пациенти с ТЕ (Argañaraz et al., 2008). Следователно, литературните данни и тези от настоящата дисертация потвърждават хипотезата, че блокирането на AT₁ рецепторите е ефективен подход за облекчаване на пластичните промени през епилептогенезата и съпътстващите я утежняващи морфологични и поведенчески последствия. Октапептидът има еднакъв афинитет към AT₁ и AT₂ рецепторите и литературните данни подкрепят идеята, че активирането им AT₁/AT₂ определя противоположни ефекти на Анг II (von Bohlen und Halbach, 2006). Текущите резултати показват, че както третирането с Анг II, така и с лосартан има невропротективен ефект селективно в СА1 полето на дорзален хипокамп при нормотензивни плъхове. От друга страна, за разлика от октапептида, AT₁ рецепторния антагонист облекчава КА-индуцираните пластични промени след ЕС и намалява честотата на спонтанните епилептични пристъпи. Тези резултати потвърждават предполагаемата роля на AT₂ рецепторната активация както при екзогенно приложен Анг II, така и ендогенното му действие в резултат на блокиране на AT₁ рецепторите. В подкрепа на това предложение е изследването на Wilms et al. (2005), посочващо, че AT₁ и AT₂ рецепторите показват противоположни ефекти върху невроналното увреждане, причинено от инсулт или мозъчна травма, с протекция в резултат от активиране на AT₂ рецептора. Освен това, Bar-Klein и съавтори (2014) наскоро показаха, че третирането с лосартан потиска епилептогенезата при модел на съдово увреждане чрез кортикално прилагане на албумин при Wistar плъхове, като допускат, че ефектите на лосартана са

опосредствани от потискане на TGF- β и/или AT1 рецепторна блокада. Ангиотензиновите AT1 и AT2 рецептори липсват или са експресирани в малки количества в мозъчни структури при бозайници (Wright et al., 2008), но при патологични условия търпят пластична повишена регулация в хипокам както при модели на епилепсия, така и при пациенти с TE (Wilms et al., 2005; Pereira et al., 2010; Gouveia et al., 2012). Другото обяснение може да бъде, че екзогенният Анг II упражнява косвен модулиращ ефект върху инхибиторната невротрансмисия (Albrecht et al., 1997; Armstrong et al., 1996; Naas et al., 1980; Palovcik et al., 1984), което предполага бъдещи изследвания, свързани с използването на допълнителни фармакологични, биохимични и имунохистохимични подходи, които биха спомогнали да се изясни на какво ниво се реализират тези взаимодействия.

Продължителното блокиране на AT₁ рецепторите през KA-индуцираната епилептогенеза показва различна ефикасност по отношение на поведенческите последствия свързани с импулсивност и депресия, структура-зависима невропротекция и пластични промени в AT1 рецепторната експресия през хроничната фаза у нормотензивни и спонтанно хипертензивни плъхове. Тези резултати може да се предположи, че се дължат на промени в експресията на ангиотензиновите рецептори при модел на коморбидна хипертония и епилепсия. Необходими са, обаче допълнителни изследвания за доказване на тази хипотеза. По-рано е показано, че лосартан индиректно потиска симпатиковата активност, което корелира с ефектите на препарата върху артериалното кръвно налягане при хипертензивни плъхове (Ye et al., 2002). Въпреки че в това изследване не е измервано артериалното налягане на фона на епилепсия, можем да приемем, че продължителният прием на лосартан в доза 10 mg/kg/ден го понижава, базирано на по-ранни резултати при интактни SHR (Pechlivanova et al., 2010). Поведенческите данни, отнасящи се до третиране с лосартан често са противоречиви, което се дължи на различия в експерименталните протоколи сред лабораториите, както и на различни подходи на третиране (централно спрямо системно/периферно или еднократно спрямо хронично) и използваните породи. Srinivasan и съавтори (2003) показват, че еднократното инжектиране на 10 mg/kg лосартан увеличава двигателната активност при нормотензивни Wistar плъхове, като същевременно облекчава хиперактивността при интактни SHR. В настоящия експеримент продължителното третиране с лосартан намалява двигателната активност при интактни SHR главно по време на светлата фаза, подобно на установения ефект при нормотензивни плъхове. За разлика от Wistar плъхове с епилепсия, обаче, AT1

рецепторният антагонист не предотвратява КА-индуцираната хиперактивност при SHR плъхове, което предполага порода-специфичен отговор като резултат на блокирането на AT1 рецептора при патологично състояние. Настоящите изследвания кореспондират с тези на други автори, че в допълнение към хипертензивното състояние, епилептогенезата допринася за повишаване експресията на AT1 рецепторите в хипокамп както при животински модели на епилепсия, така и при пациенти с епилепсия (Gouveia et al. (2012), Pereira et al., 2010). Въпреки, че блокирането на AT1 рецептора оказва благоприятен ефект върху поведенческите отклонения свързани с ЕС при Wistar плъховете, не повлиява импулсивното поведение и коморбидна депресия при хипертензивните плъхове, което предполага участие на друг механизъм в ефектите на лосартан при модел на коморбидна хипертония и епилепсия.

Блокирането на AT1 рецепторите не предотвратява развитието на епилепсия след епилептичен статус, но облекчава спонтанната епилептиформена активност и след преустановяване на третирането с лосартан и при Wistar и при SHR плъхове. Това се дължи вероятно на установените пластични промени в AT1 рецепторната експресия, които обаче са порода-зависими. Антихипертензивният препарат показва по-силно изразени супресивни ефекти по отношение промените в рецепторната експресия при хипертензивната порода, което вероятно е свързано с различията в PAC между двете породи, както е известно от литературните данни (Meyer et al., 1990; Tamura et al., 1996; Shibata et al., 1993). Тези различия в ефикасността на лосартана не корелират с такива по отношение на честотата на спонтанните епилептични пристъпи между двете породи. В допълнение, докато при нормотензивните плъхове невропротекцията вследствие третирането с AT1 рецепторния агонист е показана в CA1 полето на хипокампа, при SHR плъхове тя е установена в CA3 полето на хипокамп. В заключение, за да бъде напълно изяснен функционалния корелат на показаните в този труд порода-зависими различия в ефективността на лосартана при модел на темпорална епилепсия са необходими по-нататъшни проучвания на възможни допълнителни механизми имащи отношение към хипертонията и потвърждаващи участието на AT2 рецепторите в показаните ефекти на антихипертензивния препарат.

ГЛАВА 6: ИЗВОДИ

1. Продължителната интрацеребровентрикуларна инфузия с Анг II след КА-индуциран епилептичен статус утежнява епилептогенезата и съпътстващите я поведенчески отклонения, включително импулсивното поведение и коморбидна депресия при нормотензивни плъхове, но същевременно оказва невропротекция в СА1 полето на хипокамп.
2. Хроничното третиране с лосартан след КА-предизвикан епилептичен статус проявява антиепилептогенен ефект намалявайки гърчовата честота и след преустановяване на третирането при нормотензивни и спонтанно хипертензивни плъхове, но без да предотвратява развитието на епилептогенезата и развитието на хронична фаза на епилепсия.
3. За разлика от Wistar плъхове с епилепсия, при SHR плъховете липсва прогресия в честотата на пристъпите два месеца след преустановяване на третирането, което корелира с по-голяма ефикасност на лосартана при SHR плъхове в сравнение с нормотензивни плъхове върху пластичните промени в AT1 рецепторната експресия през хроничната фаза.
4. Продължителното третиране с AT1 рецепторния антагонист лосартан облекчава съпътстващите епилепсията поведенчески отклонения, включително импулсивно поведение и коморбидна депресия при нормотензивни плъхове.
5. Установената невропротекция в СА1 полето на хипокамп след третиране с Анг II или AT1 рецепторен антагонист на нормотензивните Wistar плъхове дава основание да се допуска ефектите на двата агента да се дължат на активиране на мозъчните AT2 рецептори през хроничната фаза на епилепсията.
6. Хроничната подкожна инфузия със селективния AT1 рецепторен антагонист лосартан облекчава КА-предизвикания епилептичен статус и съпътстващ оксидативен стрес в по-голяма степен при модела на есенциална хипертония порода SHR в сравнение с нормотензивните Wistar плъхове.
7. За разлика от порода Wistar, третирането с лосартан показва невропротективен ефект в СА3с полето при SHR плъхове, предполагайки порода-зависимо участие на AT2 рецепторите в невропротективния ефект на лосартана.
8. Ангиотензовата система няма съществена роля в съпътстващите хроничната фаза на епилепсията увреждания на хипокамп-зависимата пространствена памет у двете породи плъхове.

ГЛАВА 7: СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път е установено, че хроничната инфузия с Анг II утежнява епилептогенезата чрез скъсяване на латенцията за поява на спонтанни епилептични пристъпи и увеличаване на честота им при нормотензивни плъхове, но същевременно оказва невропротекция в СА1 поле на дорзален хипокамп.
2. Установено е, че продължителната инфузия с Анг II след епилептичен статус допълнително утежнява коморбидната депресия и хиперактивност, характерни за хроничната фаза на епилепсията и през двете фази на денонощния цикъл при нормотензивни плъхове.
3. Получени са оригинални данни за антиепилептогенната роля на блокиране на AT₁ рецепторите с лосартан след каинат-индуциран епилептичен статус, оказващо невропротекция в СА1 поле на дорзален хипокамп на нормотензивни плъхове.
4. Установено е, че продължителното блокиране на AT₁ рецептори на нормотензивни плъхове след епилептичен статус облекчава коморбидната депресия и хиперактивност, характерни за хроничната фаза на епилепсия, през светлата фаза на денонощния цикъл.
5. За първи път е установено, че блокирането на AT₁ рецепторите след каинат-индуциран епилептичен статус има антиепилептогенно действие, което корелира с невропротекция в СА3 поле на дорзален хипокамп и хилус на гирус дентатус без да повлиява поведенческите отклонения при модел на коморбидна хипертония и епилепсия.
6. Получени са оригинални данни за пластичните промени в AT₁ рецепторната експресия в дорзален хипокамп през хроничната фаза на модел на темпорална епилепсия, както и че блокирането на AT₁ рецепторите с лосартан потиска експресията им в по-голяма степен при спонтанно хипертензивни плъхове в сравнение с нормотензивни плъхове.
7. Получени са оригинални данни, че субхроничното претретиране с лосартан удължава периода за поява на каинат-предизвикан епилептичен статус при спонтанно хипертензивни плъхове и облекчава оксидативния стрес при хипертензивни и нормотензивни плъхове.

ГЛАВА 8: ПРИЛОЖЕНИЯ

8.1. Публикации

Ivanova N., Pechlivanova, D., Tchekalarova, J., Popov, D., Markova, P., Stoynev, Al. Beneficial effects of chronic treatment with losartan on behavioural disturbances in kainate model of temporal lobe epilepsy. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 2013, 66 (12), 1761-1768. ISSN 1310-1331, IF = 0.211

Ivanova N., Pechlivanova D., Tchekalarova J. Behavioural effects of chronic losartan treatment after kainic acid status epilepticus. *Proceedings of the International fourth workshop on experimental models and methods in biomedical research, HO7. May 27-29, 2013 ; Sofia, Bulgaria*, 167-170

Ivanova NM, Atanasova D, Pechlivanova DM, Mitreva R, Lazarov N, Stoynev AG, Tchekalarova JD. Long-term intracerebroventricular infusion of angiotensin II after kainate-induced status epilepticus: Effects on epileptogenesis, brain damage, and diurnal behavioral changes. *Epilepsy Behav.* 2015 Oct;51:1-12. doi: 0.1016/j.yebeh.2015.06.036. Epub 2015 Jul 31. IF= 2.781

8.2. Участия и научни съобщения по темата на дисертационния труд

Natasha Ivanova, Daniela Pechlivanova, Milena Atanasova, Jana Tchekalarova. Effect of chronic treatment with losartan on diurnal variations of behavior of Wistar rats in kainate model of temporal lobe epilepsy. Poster. *Trakia University, Faculty of medicine, scientific anniversary conference with international participation "30 years Higher Medical Education"*, May 21-22, 2012; Stara Zagora, Bulgaria

N. Ivanova, J. Tchekalarova, D.Pechlivanova, A. Stoynev. Effects of long-term treatment with losartan on behavioural disturbances in kainate model of temporal lobe epilepsy“. Poster. *The 4th London-Innsbruck Colloquium on Status Epilepticus and acute seizures*, 4-5 April, 2013; Salzburg, Austria

Ivanova Natasha. Behavioural effects of chronic losartan treatment after kainic acid status epilepticus. Oral presentation. Fourth workshop on experimental models and methods in biomedical research at the Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum. 29 May, 2013; Sofia, Bulgaria

Natasha Ivanova, Jana Tchekalarova, D. Pechlivanova, Stoynev. Effect of long-term treatment with ang II on diurnal variations of behavior of wistar rats in kainate model of temporal lobe epilepsy. Poster. 16th Congress of the European Neuroendocrine Association. 10-13 September, 2014; Sofia, Bulgaria

Dimitrinka Atanasova, Natasha Ivanova, Jana Tchekalarova, Nikolai Lazarov. 106 annual meeting of European Association of Clinical Anatomy. Poster. Effects of long-term losartan treatment during epileptogenesis on the development of chronic epileptic state and diurnal rhythms of behavioural changes in Wistar rats. 24-27 Sep, 2014; Salzburg, Austria

Ivanova N., Pechlivanova D., Kortenska L., Markova P., Tchekalarova J. “Effect of long-term losartan treatment on diurnal variations of depressive-like behavior in spontaneously hypertensive rats in kainate model of temporal lobe epilepsy”. Abstract. Journal of Biomed Clin Res vol. 7(1) 2014

Ivanova N, Pechlivanova D., Kortenska L., Markova P., Tchekalarova J. “Effect of long-term losartan treatment on diurnal variations of depressive-like behavior in spontaneously hypertensive rats in kainate model of temporal lobe epilepsy”. Poster. Seventh national congress of pharmacology, Medical University – Pleven 17-19 October 2014; Pleven, Bulgaria

Наташа Иванова, Даниела Пехливанова, Димитрина Атанасова, Румяна Митрева, Николай Лазаров, Яна Чекаларова. Ефекти на ангиотензиновата система върху гърчова активност, мозъчни увреждания и денонощни промени в поведението при каинатен модел на темпорална епилепсия: Продължителна интрацеребровентрикуларна инфузия на Анг II. Научно съобщение. Научна Конференция „Невронауки – от теорията до експеримента”, Институт по Невробиология, 4 декември, 2014 г., София, България

Наташа Иванова, Даниела Пехливанова, Димитрина Атанасова, Лидия Кортенска, Румяна Митрева, Николай Лазаров, Яна Чекаларова. Ефекти на ангиотензиновата система върху гърчова активност, мозъчни увреждания и денонощни промени в поведението при каинатен модел на темпорална епилепсия: Продължително третиране с лосартан. Научно съобщение. Научна Конференция „Невронауки – от теорията до експеримента”, Институт по Невробиология, 4 декември, 2014 г., София, България

Н. Иванова, М. Шишманова, К. Георгиева, Р. Митрева, Я. Чекаларова. Физическа тренировъчна програма при спонтанно хипертензивни плъхове има защитен ефект срещу каинат индуцирана епилептогенеза. Научно съобщение. Научна Конференция „Невронауки – от теорията до експеримента”, Институт по Невробиология, 4 декември, 2014 г., София, България

Наташа Иванова. Ангиотензинови рецептори като терапевтична цел при епилепсия. Презентация. Институт по Невробиология, 25 юни, 2015 г., София, България

Наташа Иванова, Димитрина Атанасова, Даниела Пехливанова, Румяна Митрева, Николай Лазаров, Яна Чекаларова. Ефекти на дългосрочна интрацеребровентрикуларна инфузия с Анг II върху епилептогенеза, мозъчни увреждания и пространствена памет при каинатен модел на темпорална епилепсия. Постер. XI конгрес на Българското дружество по физиологични науки, МУ - Пловдив, 9-11 октомври, 2015 г.; Пловдив, България

SUMMARY

The results presented in this paper extend the knowledge about the role of renin angiotensin system on the development of epileptogenesis and its accompanying complications. The effects of long-term treatment with Ang II and the antihypertensive drug losartan, respectively, on the incidence of spontaneous motor seizures, behavioral changes, neuronal loss and AT1 receptor expression in the kainate model of temporal epilepsy with comorbid hypertension were investigated. The effects of the AT1 receptor antagonist losartan administered by subchronic infusion prior to the neuronal toxin kainic acid were studied to elucidate the involvement of AT1 receptors in the development of epileptic status and subsequent oxidative stress in a model of essential hypertension.

It was found that long-term intracerebroventricular infusion of Ang II after KA-induced status epilepticus aggravates epileptogenesis and concomitant behavioral abnormalities, including impulsive behavior and comorbid depression in normotensive rats, but at the same time produces neuroprotection in the CA1 area of hippocampus. The chronic treatment with losartan after KA-induced epileptic status causes an anti-epileptogenic effect by decreasing the number of spontaneous recurrent seizures in normotensive and spontaneously hypertensive rats. It was further shown that blocking of the AT1 receptors antagonist alleviates epileptic concomitant abnormalities including impulsive behavior and comorbid depression in normotensive rats. The established neuroprotection in the CA1 area of hippocampus after treatment with Ang II or AT1 receptor antagonist in normotensive Wistar rats might be due to activation of the brain AT2 receptors during the chronic phase of epilepsy. These results provide evidence that the chronic subcutaneous infusion with the selective AT1 receptor antagonist losartan alleviates kainate-induced epileptic status and concomitant oxidative stress and suppresses the AT1 receptor expression more pronounced in the SHR as a model of essential hypertension than to normotensive Wistar rats. The data demonstrate the neuroprotection of losartan treatment in the CA3c area of hippocampus of SHR and CA1 area of Wistar rats, suggesting a strain-dependent involvement of AT2 receptors in this effect.

The present findings suggest that the AT1 receptors play a significant role in neuronal injury after status epilepticus and unveils its role in abnormal as well as in normal behavior.